
Funktionelle Charakterisierung von RNA abhängigen RNA Polymerasen aus *Dictyostelium discoideum*

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium

**genehmigte Dissertation von
Dipl.-Biol. Stephan Wiegand
aus Kassel**

1. Referent: Dr. C. Hammann
2. Referent: Prof. Dr. U. Göringer

Tag der Einreichung: 24.05.2012
Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2012

Darmstadt 2012
D17

1. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Eine Ausnahme stellt die folgende Publikation dar, in der Teile dieser Arbeit publiziert wurden:

Wiegand, S., Kruse, J., Gronemann, S. and Hammann, C. (2011) Efficient generation of gene knockout plasmids for *Dictyostelium discoideum* using one-step cloning. *Genomics*, **97**, 321-325.

Darmstadt, den 24.05.2012

.....
(Stephan Wiegand)

2. Inhaltsverzeichnis

1.	Ehrenwörtliche Erklärung	1
2.	Inhaltsverzeichnis	2
3.	Zusammenfassung	5
4.	Summary	8
5.	Einleitung	10
5.1.	RNA-vermittelte Genregulation	10
5.2.	Der RNA Interferenz (RNAi) Mechanismus	12
5.2.1.	Dicer	12
5.2.2.	RNA induced silencing complex (RISC)	14
5.2.3.	RNA abhängige RNA Polymerasen (RdRPs)	16
5.3.	Biogenese und Funktionen kleiner regulatorischer RNAs	19
5.3.1.	siRNAs	20
5.3.2.	miRNAs	23
5.4.	Strukturelle und biochemische Eigenschaften von RdRPs	26
5.5.	RNAi und RdRPs in <i>Dictyostelium discoideum</i>	27
5.6.	<i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus	29
6.	Zielsetzung	31
7.	Materialien	32
7.1.	Geräte und Apparaturen	32
7.2.	Verbrauchsmaterialien	34
7.3.	Chemikalien	35
7.4.	Puffer und Lösungen	37
7.5.	Antibiotika	41
7.6.	Nährmedien	41
7.6.1.	Medien für <i>Escherichia coli</i>	41
7.6.2.	Medien für <i>Dictyostelium discoideum</i>	41
7.7.	Nukleotide	42
7.8.	Antikörper	42
7.9.	Kits	43
7.10.	Größenstandards	43
7.11.	Enzyme und Enzympuffer	43
7.12.	Oligonukleotide	44
7.13.	Software	44
7.14.	Sequenzen	44
7.15.	Plasmide	45
7.16.	Bakterienstämme	46
7.17.	<i>Dictyostelium</i> -Stämme	46
8.	Methoden	47
8.1.	Zellbiologische Methoden	47
8.1.1.	Anzucht von <i>E. coli</i>	47
8.1.2.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen mit der CaCl_2 Methode	47
8.1.3.	Transformation von <i>E. coli</i>	47
8.1.4.	Blau-Weiß Selektion	48
8.1.5.	Anzucht von <i>K. aerogenes</i>	48
8.1.6.	Anzucht von <i>D. discoideum</i>	49

8.1.7.	Herstellung von Sporen von <i>D. discoideum</i>	49
8.1.8.	Transformation von <i>D. discoideum</i> durch Elektroporation	50
8.1.9.	Subklonierung von <i>D. discoideum</i>	50
8.1.10.	Erstellung eines RNA Expressionsprofils während der Entwicklung von <i>D. discoideum</i> (<i>developmental time course</i>)	51
8.2.	Präparation von Nukleinsäuren	52
8.2.1.	Plasmidminipräparation	52
8.2.2.	Plasmidmaxipräparation	52
8.2.3.	Präparation chromosomaler DNA aus <i>D. discoideum</i>	53
8.2.4.	Präparation chromosomaler DNA aus <i>D. discoideum</i> im kleinen Maßstab	54
8.2.5.	Präparation von Gesamt-RNA aus <i>D. discoideum</i>	54
8.3.	Molekularbiologische Methoden	55
8.3.1.	Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese	55
8.3.2.	Reinigung von Nukleinsäuren	56
8.3.3.	Endonukleolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	58
8.3.4.	Ligation von DNA-Fragmenten	58
8.3.5.	Modifikation von DNA-Enden für Ligationen	59
8.3.6.	Polymerase Kettenreaktion	60
8.3.7.	Reverse Transkription	61
8.3.8.	Quantitative PCR (qPCR)	62
8.3.9.	Herstellung von Gendeletionsvektoren mittels pKOSG System	64
8.3.10.	Southern Blot	65
8.3.11.	Northern Blot	67
8.3.12.	Northern Blot zum Nachweis kleiner RNAs	67
8.3.13.	Herstellung von radiativ markierten Nukleinsäuren	69
8.3.14.	Verwendete Sonden und Hybridisierungsbedingungen	71
8.4.	Proteinbiochemische Methoden	73
8.4.1.	Isolierung von Gesamtprotein aus <i>D. discoideum</i>	73
8.4.2.	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	73
8.4.3.	Coomassie Färbung	74
8.4.4.	Ponceau-Rot Färbung	74
8.4.5.	Western Blot und immunologischer Nachweis	75
8.4.6.	Enzymatischer Nachweis von β -Galactosidase mittels ONPG Assay	76
9.	Ergebnisse	78
9.1.	Klonierung der genomischen Sequenzen der RdRPs	78
9.2.	Nachweis und Quantifizierung der Expression der RdRPs während der Entwicklung von <i>D. discoideum</i>	79
9.3.	RdRP <i>knock out</i> Stämme	81
9.3.1.	Herstellung und Verifizierung von RdRP <i>knock out</i> Stämmen	81
9.3.2.	Discoidin Reportersystem in RdRP <i>knock out</i> Stämmen	85
9.4.	RdRP Deletionsstämme	88
9.4.1.	Prinzip der Herstellung von Gendeletionsvektoren mittels pKOSG System	88
9.4.2.	Validierung des pKOSG Systems	90
9.4.3.	Multiple RdRP Deletionsstämme	94
9.5.	Veränderungen endogener RNAs in RdRP Deletionsstämmen	97
9.5.1.	Retrotransposon DIRS-1	97
9.5.2.	Retrotransposon Skipper	102
9.5.3.	microRNAs	105
9.6.	Das CadA Reportersystem	106
9.6.1.	Konzeption des CadA Reportersystems	106
9.6.2.	Analyse von pDM304 <i>cadA hairpin</i> II in RdRP <i>single</i> Deletionsstämmen	108

9.6.3.	Analyse von pDM304 <i>cadA hairpin</i> II in <i>rrpA</i> ^{—H.M.}	109
9.6.4.	Analyse von pDM326 <i>cadA hairpin</i> II in RdRP Deletionsstämmen	110
9.6.5.	Analyse von pDM326 <i>cadA hairpin</i> III / IV in RdRP Deletionsstämmen	112
9.6.6.	Analyse von pDM326 <i>cadA antisense</i> und <i>sense</i> in RdRP Deletionsstämmen	113
9.6.7.	Zusammenfassung der mit dem CadA Reportersystem erzielten Ergebnisse ...	116
9.7.	Das β -Gal Reportersystem	117
9.7.1.	Konzeption und Etablierung des β -Gal Reportersystems	117
9.7.2.	Analyse von pDM326 β -gal <i>hairpin</i> in RdRP Deletionsstämmen	121
9.7.3.	Analyse von pDM326 β -gal <i>sense</i> und <i>antisense</i> in RdRP Deletionsstämmen	123
9.7.4.	Zusammenfassung der mit dem β -Gal Reportersystem erzielten Ergebnisse ...	125
10.	Diskussion	126
10.1.	RdRPs in <i>D. discoideum</i>	126
10.1.1.	Expressionsanalyse und Klonierung der RdRPs	126
10.1.2.	RdRP <i>knock out</i> Stämme und das Discoidin Reportersystem	127
10.2.	RdRP Deletionsstämmen	129
10.2.1.	Herstellung von RdRP Deletionsstämmen mittels pKOSG System	129
10.2.2.	RdRP Deletionstämmen	130
10.3.	Veränderungen endogener RNAs in RdRP Deletionsstämmen	131
10.4.	Das CadA Reportersystem	139
10.5.	Das β -Gal Reportersystem	142
11.	Abkürzungsverzeichnis	145
12.	Literaturverzeichnis	147
13.	Anhang	163
13.1.	Plasmide	163
13.1.1.	Vektoren zur Herstellung von Ribo Sonden	163
13.1.2.	Klonierung der genomischen Sequenz der RdRPs	164
13.1.3.	Vektoren zur Herstellung von RdRP <i>knock out</i> Stämmen	165
13.1.4.	Discoidin Reportersystem	166
13.1.5.	Vektoren zur Herstellung von RdRP Deletionsstämmen	167
13.1.6.	Extrachromosomale Vektoren für <i>D. discoideum</i>	169
13.1.7.	β -Gal Reportersystem	170
13.1.8.	CadA Reportersystem	173
13.2.	Verwendete Primer zur Analyse potentieller RdRP KO Stämme	176
13.3.	Zusätzliche Abbildungen	177
13.4.	Oligonukleotide	181
14.	Danksagung	184
15.	Lebenslauf	185

3. Zusammenfassung

Zellulär kodierte RNA abhängige RNA Polymerasen (*RNA-dependent RNA polymerases*, RdRPs) katalysieren die Synthese eines RNA Strangs komplementär zu einer einzelsträngigen RNA Matrize. RdRPs sind in vielen eukaryotischen Organismen in RNA-vermittelte Genregulationsprozesse involviert und in einigen Organismen notwendig für einen funktionierenden RNA Interferenz (RNAi) Mechanismus (zusammengefasst in Maida and Masutomi, 2011). Vor Beginn dieser Arbeit konnten im Genom von *Dictyostelium discoideum* drei Gene identifiziert werden, welche für die RdRP Homologe RrpA, RrpB und RrpC kodieren (Martens et al., 2002).

Zur funktionellen Charakterisierung der RdRP Homologe in *D. discoideum* wurden mittels homologer Rekombination RdRP *single*, *double* und *triple* Deletionsstämme in allen möglichen Kombinationen generiert. Hierbei wurde zur Herstellung von Gendeletionsvektoren das pKOSG System entwickelt, das auf dem StarGate®-*combinatorial cloning* System und dem pLPBLP Vektor basiert (Wiegand et al., 2011). Die für die homologe Rekombination notwendigen Bereiche, können bei diesem System in Form von zwei PCR Produkten durch *combinatorial cloning* in einer höchst effizienten Einschritt-Reaktion in ein allgemeines, organismenspezifisches Akzeptor System integriert werden. In vergleichenden Studien von Gendeletionsvektoren, welche mittels konventioneller Klonierung erstellt wurden, konnten keine funktionellen Unterschiede festgestellt werden. Aufgrund des deutlich reduzierten Zeit- und Materialaufwands bei der Erstellung von Gendeletionsvektoren, stellt das neu entwickelte pKOSG System eine deutliche Verbesserung gegenüber einer konventionellen Klonierungsstrategie dar.

Im Weiteren wurde der Einfluss von RdRPs und DrnB, einem Dicer-ähnlichen Protein in *D. discoideum*, auf endogene RNAs untersucht. Zunächst wurde festgestellt, dass RdRPs in *D. discoideum* nicht essentiell sind. Dennoch haben sie eine zentrale Funktion im RNA vermittelten Stilllegungsmechanismus der LTR Retrotransposons DIRS-1 und Skipper. Hierbei wurde in Northern Analysen erstmalig eine bidirektionale Transkription von DIRS-1 Elementen detektiert. Des Weiteren konnte eine drastische Reduktion von DIRS-1 spezifischen siRNAs in Northern Blots und in *deep sequencing* Analysen in allen untersuchten *rrpC* Deletionsstämmen festgestellt werden. Parallel wurde eine Akkumulation von DIRS-1 *sense* Transkripten in diesen Stämmen beobachtet. Mit Hilfe dieser Ergebnisse

lässt sich ein Modell für einen RNA-vermittelten Stilllegungsmechanismus von DIRS-1 postulieren. Bidirektionale DIRS-1 Transkripte, welche aus der Promotoraktivität der invertierten LTRs resultieren, werden demnach zunächst durch das Dicer-ähnliche Protein DrnA zu primären siRNAs prozessiert. Im Folgenden vermittelt RrpC die Synthese von sekundären siRNAs, wobei primäre siRNAs als Primer an der DIRS-1 *sense* RNA fungieren. Die durch RrpC synthetisierten Doppelstränge werden wiederum durch DrnA geschnitten woraus ein post-transkriptioneller Abbau der DIRS-1 *sense* Transkripte resultiert.

Im Gegensatz zu DIRS-1 siRNAs akkumulierten Skipper spezifische siRNAs in *rrpC* Deletionsstämmen. Überraschenderweise wurde eine Anreicherung von längeren Skipper spezifischen Transkripten in *rrpA* Deletionsstämmen und vor allem im *drnB* Deletionsstamm beobachtet. Darüber hinaus konnte in *rrpC* Deletionsstämmen eine drastische Akkumulation von zwei putativen micro RNAs detektiert werden. Dies deutet auf mögliche regulatorische Funktionen von RrpC in der Biogenese von micro RNAs hin, was im Einklang mit bereits publizierten Untersuchungen steht (Hinas et al., 2007).

Zur Analyse des RNAi Mechanismus in *D. discoideum* wurden zwei Reportersysteme entwickelt. Im ersten konnte die Menge an mRNA des Endogens *cadA* durch Transkription von extrachromosomalen sequenzhomologen *cadA Silencing* Konstrukten reduziert werden. Nur durch Einsatz eines *hairpin* Konstrukts, welches annähernd die gesamte kodierende Sequenz von *cadA* abdeckte, konnte eine Reduktion der mRNA in allen RdRP Deletionsstämmen ausgelöst werden. Bei Expression von kürzeren *hairpin* RNAs sowie bei *antisense* RNAs wurden dagegen keine Veränderungen beobachtet. CadA spezifische siRNAs, welche aus der Prozessierung des primären Auslösers resultieren, konnten dagegen für alle exprimierten *hairpin* und *antisense* RNAs nachgewiesen werden, wobei deren Menge und Prozessierung unabhängig von der Aktivität von RdRPs erfolgte, da sich alle untersuchten RdRP Deletionsstämme wie der AX2 Wildtyp verhielten.

Mit dem β -Gal Reportersystem konnte ein zweites, heterologes System zur Untersuchung von RNA-vermittelten Genregulationsprozessen in *D. discoideum* etabliert werden. Die Expression des Transgens *lacZ* und die nachfolgende Expression von sequenzhomologen β -gal *Silencing* Konstrukten, erfolgte hierbei von zwei getrennten Vektoren mit unterschiedlichen Selektionsmarkern. Die β -Gal Aktivität konnte durch Expression einer *hairpin* RNA, aber auch durch Expression einer *antisense* RNA im AX2 Wildtyp und in allen untersuchten RdRP und *drnB* Deletionsstämmen um mindestens 50% reduziert werden. Dies

wurde jedoch nicht durch eine Reduktion der *lacZ* mRNA Menge verursacht, die in beiden Fällen konstant blieb. Nachweise von siRNAs nach Expression der β -gal *hairpin* RNA zeigten, dass eine Prozessierung zu siRNAs erfolgte, was in schwächerem Maße auch für die *antisense* RNA beobachtet wurde. Diese wirken demnach als Inhibitoren der Translation. Zusätzlich wurde nach Expression der β -gal *hairpin* RNA ein *spreading* von β -gal siRNAs 5' zur Position des primären Auslösers beobachtet. Die Entstehung dieser sekundären siRNAs erfolgte in Abhängigkeit von *rrpC* und *drnB*.

Die Ergebnisse beider Reportersysteme deuten darauf hin, dass RdRPs nicht zwingend notwendig für RNAi-vermitteltes post-transkriptionelles *Silencing* und translationale Repression in *D. discoideum* sind.

4. Summary

Cellular encoded RNA-dependent RNA polymerases (RdRPs) catalyse the formation of complementary RNA strands, using a single-stranded RNA molecule as their template. RdRPs are in numerous eukaryotes in RNA-mediated gene regulation processes involved and in some organisms required for RNA interference (summarized in Maida and Masutomi, 2011). Previous studies identified in the genome of the single cell amoeba *Dictyostelium discoideum* three genes, which encode the RdRP homologues RrpA, RrpB and RrpC (Martens et al., 2002).

For functional characterization of three RdRPs in *D. discoideum* RdRP single, double and triple deletion strains in all possible combinations were generated by homologous recombination. For this purpose, the pKOSG system for generation of gene deletion plasmids was established, which is based on the Star Gate[®] combinatorial cloning system and the pLPBLP vector (Wiegand et al., 2011). This system allows the integration of the two areas required for homologous recombination in a one-step reaction by inserting two PCR products into an organism-specific generic acceptor system. Comparative studies to deletion vectors, which were generated by conventional cloning, showed no functional differences. Saving cost and time, the established pKOSG system represents a significant advancement in the generation of gene deletion plasmids compared to conventionally cloning approaches.

Furthermore the influence of RdRPs and DrnB, a Dicer-like protein in *D. discoideum* on endogenous RNAs was examined. First, it was found, that RdRPs in *D. discoideum* are not essential. However, they have a central role in RNA-mediated silencing of the LTR retrotransposons DIRS-1 and Skipper. Using Northern blots, it was possible to detect bidirectional transcripts of the DIRS-1 retrotransposon. Deep sequencing analysis and Northern blots for detection of small RNAs revealed a dramatic reduction of DIRS-1 specific siRNAs in all investigated *rrpC* deletion strains. In parallel, an accumulation of longer DIRS-1 sense transcripts was observed in these strains. The results obtained in these studies can be used to postulate a model of the RNA-mediated silencing mechanism from DIRS-1. Bidirectional DIRS-1 transcripts, which result from the promoter activity of the inverted LTRs, therefore can be initially processed by the Dicer-like protein DrnA to primary siRNAs. In the next step RrpC mediates the synthesis of secondary siRNAs using primary siRNAs as their primers, to the DIRS-1 sense RNA. The double strands synthesized through RrpC, are again processed by DrnA, resulting in a post-transcriptional degradation of DIRS-1 sense transcripts.

Unlike DIRS-1 siRNAs Skipper specific siRNAs accumulated in *rrpC* deletion strains. Surprisingly, an enrichment of longer Skipper specific transcripts was observed only in *rrpA* deletion strains and especially in the *drnB* deletion strain but not in the absence of *rrpC*. Moreover a dramatic accumulation of two putative micro RNAs in *rrpC* deletion strains was detected. These points to possible regulatory functions of RrpC in the biogenesis of micro RNAs, which is consistent with previously published studies (Hinas et al., 2007).

For analysis of the RNAi mechanism in *D. discoideum* two reporter systems were developed. In the first, the amount of mRNA for the endogene *cadA* was reduced, by the use of sequence homologous *cadA* silencing constructs, which are transcribed on extrachromosomal vectors. Only through a hairpin construct, which nearly covered the entire coding sequence of *cadA*, a reduction of the mRNA was triggered in all RdRP deletion strains. No changes were caused, when shorter hairpin RNAs or an antisense RNA were expressed. *CadA* specific siRNAs, which result from the processing of the primary trigger could be detected for all expressed hairpin and antisense RNAs, wherein the amount and the processing was carried out independently of the activity of RdRPs. All examined RdRP deletion strains behaved like AX2 wild type.

With the β -Gal reporter system a second, heterologous system for studying RNA-mediated gene regulation in *D. discoideum* was established. Expression of the *lacZ* transgene and the subsequent expression of sequence homologous β -gal silencing constructs, accrue in this case from two separate vectors with different selection markers. The expression of a hairpin RNA and of an antisense RNA led in AX2 wild type and in all the studied RdRP and *drnB* deletion strains to a reduction of the β -gal activity by at least 50%. This was not caused through a reduction of the β -gal mRNA levels, as they stayed constant in both cases. Detection of β -gal siRNAs after the expression of the β -gal hairpin RNA showed that processing to siRNAs was carried out. To a lesser extent, this was also observed for the antisense RNA. Accordingly these β -gal siRNAs act as inhibitors of the translation. In addition, the expression of a β -gal hairpin RNA resulted in spreading of β -gal siRNA 5' to the position of the primary trigger. The occurrence of these secondary siRNAs was dependent on the presence of *rrpC* and *drnB*. The results of both reporter systems indicate that RdRPs are not necessarily required for RNAi-mediated post-transcriptional silencing and translational repression in *D. discoideum*.

5. Einleitung

5.1. RNA-vermittelte Genregulation

RNA Moleküle übernehmen sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten zentrale regulatorische Funktionen in fundamentalen zellulären Prozessen wie Transkription und Translation, Prozessierung und Modifikation von RNA, Degradation von DNA, RNA und Proteinen, DNA Modifikation, Chromosomen-Replikation oder Chromatin-Modifikation (zusammengefasst in Carthew and Sontheimer, 2009; Ghildiyal and Zamore, 2009; Waters and Storz, 2009). Hierbei können Gene durch regulatorische RNAs transkriptionell (*transcriptional gene silencing*, TGS) oder post-transkriptionell (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) inaktiviert werden. Bei diesen Prozessen kommt es zu einer partiellen oder vollständigen Geninaktivierung, wobei als Auslöser *sense* oder *antisense* RNA, und doppelsträngige RNA (dsRNA) endogenen oder exogenen Ursprungs fungieren können.

Bereits Anfang der 1960er Jahre wurden erste Hypothesen bezüglich regulatorischer RNAs in Prokaryoten veröffentlicht (Britten and Davidson, 1969; Jacob and Monod, 1961). Erste experimentelle Beweise hierfür wurden jedoch erst bei der Untersuchung natürlich vorkommender *antisense* RNAs von Plasmiden (Stougaard et al., 1981; Tomizawa et al., 1981) und in Eukaryoten (Hildebrandt and Nellen, 1992) gefunden. Seither wurden in Eukaryoten, Bakterien, Archaeen und Viren zahlreiche natürlich vorkommende *antisense* Transkripte identifiziert und deren Funktionen dechiffriert (zusammengefasst in Lapidot and Pilpel, 2006). Bei der Untersuchung der Regulation des Membranproteins OmpF in *E. coli* konnte erstmalig durch Einführung einer komplementären *antisense* RNA die Expression eines Gens inhibiert werden (Mizuno et al., 1984). Im Folgenden wurde diese Technologie sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten zur spezifischen Stilllegung von Genen eingesetzt.

1990 entdeckte John Jorgerson, dass man in Petunien die bläulich-rote Blütenfarbe nicht durch Überexpression einer zusätzlich eingeführten Genkopie der Chalconsynthase intensivieren konnte. Vielmehr entstanden durch die neu eingebrachte *sense* RNA hellere oder sogar weiße Blüten. Dieses Phänomen wurde als Co-Suppression bezeichnet (Napoli et al., 1990). Zusätzlich wurde festgestellt, dass PTGS in Pflanzen auch durch virale Infektionen ausgelöst werden kann, was als VIGS (*virus induced gene silencing*) bezeichnet wird. Hierbei bewirkte die Infektion von Pflanzen mit dem Potato Virus X (PVX), welches zusätzlich als Reportergen β -Glucuronidase oder grün fluoreszendes Protein (GFP) beinhaltete, eine kombinierte PTGS Antwort. Pflanzen zeigten nach Infektion sowohl eine PTGS vermittelte

Virusresistenz als auch *Silencing* von zusätzlich exprimierten Kopien des Reportergens (Angell and Baulcombe, 1997; Dalmay et al., 2000a; Kasschau and Carrington, 1998; Ruiz et al., 1998). Auch in *Neurospora crassa* wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Hierbei verursachte die Expression zusätzlicher Kopien von Genen, welche in die Karotinoidsynthese involviert sind, einen Albinophänotyp, was als *Quelling* bezeichnet wurde (Cogoni et al., 1994). Analysen zeigten eine deutliche Reduktion der mRNA bei unveränderter Produktion von Primärtranskripten. Zusätzlich zeigten heterokaryotische Stämme aus Zellkernen mit und ohne Transgen ebenfalls einen Albinophänotyp. Daher wurde davon ausgegangen, dass es sich bei *Quelling* nicht um ein auf DNA Ebene wirkendes Phänomen handeln konnte, sondern ein *Silencing* der mRNA stattfinden musste (Cogoni et al., 1996). Auch in *Caenorhabditis elegans* wurde zur gleichen Zeit bei der Untersuchung des *par-1* Gens festgestellt, dass sowohl durch Injektion synthetisch hergestellter *antisense* als auch *sense* RNA *Silencing* ausgelöst werden konnte (Guo and Kemphues, 1995). Die Erkenntnis, dass auch die Einführung einer *sense* RNA zur spezifischen Stilllegung von Genen führen kann, konnten mit dem damals aktuellen Modell nicht erklärt werden, da angenommen wurde, dass mRNA und komplementäre *antisense* RNA Doppelstränge bilden und somit eine Translation verhindert würde.

Eine bahnbrechender Entdeckung zur Erklärung dieser Phänome gelang 1998 Andrew Fire, Craig Mello und Mitarbeitern durch die Entdeckung des RNA Interferenz (RNAi) Mechanismus. Sie zeigten, dass in *C. elegans* die Injektion geringster Mengen von sequenzhomologer dsRNA ausreichte, um die entsprechende mRNA fast vollständig zu eliminieren. Die Expression wurde hierbei sogar noch in Folgegenerationen reprimiert, was darauf hindeutete, dass ein *Silencing* Signal an die nächste Generation weitergegeben werden konnte. Da *Silencing* durch dsRNA um ein vielfaches wirksamer war, als bei Einsatz einer *antisense* RNA, vermuteten Fire et al. eine amplifizierende Komponente im RNAi Mechanismus (Fire et al., 1998).

Mittlerweile wurden zahlreiche unterschiedliche Komponenten und Mechanismen der RNA Interferenz in vielen eukaryotischen Organismen gefunden (vgl. Abschnitt 5.2.). Charakteristisch ist hierbei das Auftreten von kleinen 21 – 25 Nukleotide (nt) langen doppelsträngigen regulatorischen RNA-Molekülen, welche als siRNAs (*small interfering RNAs*) bezeichnet werden (Hamilton and Baulcombe, 1999). Als essentielle Proteine für RNAi konnten Homologe von RNA abhängigen RNA Polymerasen (*RNA-dependent RNA polymerases*, RdRPs), Dicer-ähnliche Proteine und Argonauten Proteine in Mitglieder der fünf eukaryotischen Superfamilien identifiziert werden (Cerutti and Casas-Mollano, 2006).

Angetrieben durch die Entwicklung von *deep sequencing* Technologien, wurden seit der Entdeckung von RNAi zahlreiche verschiedene kleine 21- 30 nt lange regulatorische RNAs mit diversen Wirkmechanismen charakterisiert. Diese können derzeit in die drei Hauptgruppen *small interfering RNAs* (Elbashir et al., 2001b), *micro RNAs* (Lee and Ambros, 2001) und *piwi-interacting RNAs* (Brennecke et al., 2007) unterschieden werden (vgl. Abschnitt 5.3.). Auch Prokaryoten beinhalten analoge RNA-vermittelte Regulationsmechanismen, welche jedoch keine Homologien zum RNAi Mechanismus in Eukaryoten aufweisen. (Shabalina and Koonin, 2008). Derzeit wird davon ausgegangen, dass es sich um evolutionär konservierte Abwehrmechanismen gegen Virusinfektionen und mobile genetische Elemente im Genom handelt (zusammengefasst in Obbard et al., 2009). Es wird vermutet, dass die hierfür notwendigen Proteinkomponenten bereits im letzten gemeinsamen Vorfahren der Eukaryoten enthalten waren und diese Proteine ursprünglich von Archaea, Bakterien und Phagen abstammen (Cerutti and Casas-Mollano, 2006; Shabalina and Koonin, 2008).

5.2. Der RNA Interferenz (RNAi) Mechanismus

Beim RNA Interferenz (RNAi) Mechanismus in seiner basalen Form werden längere doppelsträngige RNA Moleküle durch die Ribonuklease Dicer zu kleinen 21 - 25 nt langen siRNAs prozessiert, welche im Folgendem in Effektorproteinkomplexen zur post-transkriptionellen Reduktion der sequenzzhomologen mRNA führen.

5.2.1. Dicer

Mit zellfreiem Extrakt aus *Drosophila* Embryonen konnte ein *in vitro* Translationssystem entwickelt werden, in dem RNAi funktionierte, welches eine biochemische Charakterisierung einzelner Stufen und Komponenten ermöglichte. Hieraus resultierte ein erstes Modell des RNAi Mechanismus (Elbashir et al., 2001b; Tuschl et al., 1999). Im ersten Schritt werden längere doppelsträngige RNA Moleküle aus endogenen oder exogenen Quellen durch Dicer, einer ATP abhängigen Ribonuklease der RNase III Familie, in kleine 21 – 25 nt lange siRNAs prozessiert (Abb. 5.2. A bzw. Bernstein et al., 2001; Ketting et al., 2001; Zamore et al., 2000). Durch Dicer generierte siRNAs bestehen aus einem 21 – 25 nt langen Doppelstrang mit je zwei Nukleotiden Überhang an jedem 3' Ende. Chemisch sind die Enden der beiden Stränge durch eine 5'-Monophosphat- und eine 3'-Hydroxylgruppe definiert (Elbashir et al., 2001b). Weitere Studien zeigten, dass sowohl Länge als auch 3' Überhänge wichtig für ein effizientes *Silencing* sind (Elbashir et al., 2001c; Tomari and Zamore, 2005). Nach einer neuen

Klassifizierung werden Ribonukleasen der RNase III Familie in zwei Hauptklassen unterteilt (Jaskiewicz and Filipowicz, 2008). Die Klasse I beinhaltet RNase III Proteine aus Bakterien und Pilzen, während Klasse II Dicer und Drosha Proteine umfasst. Ribonukleasen der RNase III Familie sind in vielen Eukaryoten relativ gut konserviert, variieren aber beträchtlich in Struktur und Vorkommen von Proteindomänen sowie in Funktion und Anzahl im RNAi Mechanismus der jeweiligen Organismen (vgl. Abb. 5.1. bzw. zusammengefasst in Jaskiewicz and Filipowicz, 2008). Säugetiere und Nematoden z.B. beinhalten nur ein Dicer Homolog, welche sowohl siRNAs als auch microRNAs (miRNAs) prozessieren können (Hutvagner et al., 2001; Knight and Bass, 2001). In *Drosophila melanogaster* hingegen wurden zwei Dicer identifiziert, wobei miRNAs spezifisch durch Dicer-1 und siRNAs durch Dicer-2 prozessiert werden (Lee et al., 2004b). Eine ähnliche Spezialisierung konnte für die Dicer Homologe DCL1-4 in *Arabidopsis thaliana* beobachtet werden (Kurihara and Watanabe, 2004; Xie et al., 2005; Xie et al., 2004). Aufgrund ihrer zentralen Funktionen sind Dicer-ähnliche Proteine essentiell im RNAi Mechanismus vieler Organismen aber auch z.B. in der Embryonalentwicklung von Mäusen und Zebrafischen (Bernstein et al., 2003; Wienholds et al., 2003).



Abb. 5.1.: Klassifizierung von RNase III Enzymen. Klasse I bilden RNase III Orthologe aus Bakterien und Pilzen und Klasse II beinhaltet Dicer und Drosha Homologe. Die Abbildung zeigt schematisch die Domänen Organisation für ausgewählte Proteine der RNase III Familie (Abb. aus Jaskiewicz and Filipowicz, 2008).

Dicer Homologe in humanen Zellen beinhalten eine N-terminale DExH RNA Helicase / ATPase Domäne, gefolgt von einer DUF283 Domäne, einer PAZ-Domäne (PIWI, Argonaut Zwille), zwei Ribonuklease III Domänen und eine C-terminale dsRBD (*double stranded RNA-binding domain*) (vgl. Abb. 5.1.). Genetische und biochemische Untersuchungen sowie Kristallstrukturen eines Dicer Homologs in *Giardia intestinalis* führten zu einem Modell wie dsRNA durch Dicer Homologe zu siRNAs prozessiert werden kann (Macrae et al., 2006; Zhang et al., 2004). Doppelsträngige RNA Moleküle, vor allem mit kurzen 2 Nukleotide langen Überhängen am 3' Ende werden hierbei durch die PAZ Domäne gebunden. Die zwei RNase III Domänen vermitteln eine versetzte Spaltung des Doppelstrangs, wodurch die Enden wieder 2 Nukleotide lange 3' Überhänge aufweisen. Die Länge der siRNAs wird durch die Distanz zwischen der RNA bindenden PAZ Domäne und den RNase III Domänen, welche ein intramolekulares Dimer bilden, bestimmt.

5.2.2. RNA induced silencing complex (RISC)

In Mammalia und *Drosophila* werden in der Folge siRNAs aber auch miRNAs in einen Ribonukleoproteinkomplex inkorporiert, welcher als *RNA induced silencing complex* (RISC) bezeichnet wird (vgl. Abb. 5.2. B). In *Drosophila* konnte nachgewiesen werden, dass sich dieser Prozess in mehreren Schritten mit definierten Zwischenstufen vollzieht (zusammengefasst in Tomari and Zamore, 2005). Hierbei werden siRNAs zunächst in einem Heterodimerproteinkomplex, bestehend aus R2D2 und Dicer-2, gebunden (Liu et al., 2003; Pham et al., 2004). R2D2 bindet an das thermodynamisch instabilere Ende der doppelsträngigen siRNA, wodurch festgelegt wird, welcher siRNA Strang in RISC verbleibt, der dann als *guiding* Strang bezeichnet wird (Schwarz et al., 2003; Tomari et al., 2004). Nach Assemblierung weiterer unbekannter Faktoren entsteht hieraus der *RISC-loading complex* (RLC), welcher nach Bindung des Argonauten Proteins Ago2 als pre-RISC bezeichnet wird (Kim et al., 2007). Während der Aktivierung des Komplexes erfolgt eine ATP unabhängige Entwindung des siRNA Duplexes und durch die katalytische Aktivität von Ago2 wird der *passenger* Strang gespalten, wodurch dieser in der Folge aus dem Komplex entfernt wird (Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005). Der verbleibende *guiding* Strang vermittelt im aktivierten RISC, welcher nun als holo-RISC bezeichnet wird, Sequenzspezifität. Die zum *guiding* Strang komplementäre mRNA wird dann durch die *Slicer* Aktivität von Ago2 im holo-RISC gespalten (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004). Die Spaltung der Phosphodiesterbindung innerhalb der mRNA erfolgt zwischen den Nukleotiden, die sich mit dem 10 und 11 Nukleotid (relativ zum 5' Ende) des *guiding* Strangs paaren.

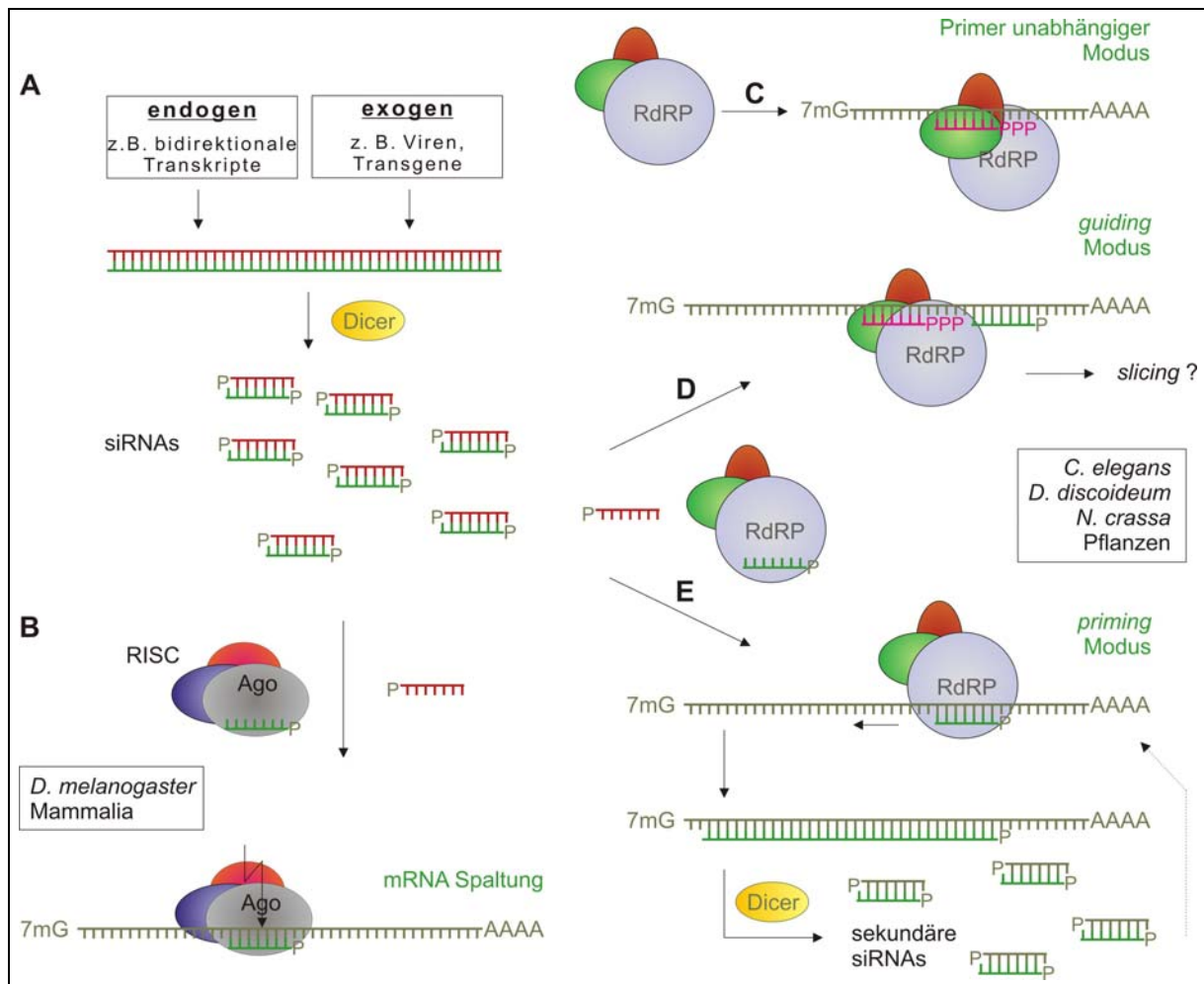


Abb. 5.2.: RNA Interferenz (RNAi) Mechanismen (Abb. nach C. Hammann, unveröffentlicht). **A:** Im RNAi Mechanismus werden längere dsRNA Moleküle endogenen und exogenen Ursprungs durch die Ribonuklease Dicer in kleine 21 – 25 nt lange siRNAs prozessiert. **B:** In Mammalia und *D. melanogaster* wird ein Strang der siRNAs, welcher als *guiding* Strang bezeichnet wird, in den *RNA induced silencing complex* (RISC) inkorporiert. Ein Argonauten Protein in RISC führt nachfolgend zur Spaltung der zum *guiding* Strang komplementären mRNA. **C – E:** Mögliche Wirkmechanismen von RNA abhängigen RNA Polymerasen (RdRPs) im RNAi Mechanismus. Im Primer-unabhängigen Modus (C) werden auf bisher unbekannte Weise einzelsträngige RNA Substrate von RdRPs und möglicherweise assoziierten Proteinen erkannt. Dies kann zur *de novo* Synthese von siRNAs oder längeren dsRNA Molekülen führen, wie es für QDE-1 aus *N. crassa* beobachtet wurde (Makeyev and Bamford, 2002). In Primer-abhängigen Modi (D und E) kann ein Strang der primären siRNAs mit einer RdRP sowie möglicherweise assoziierten Proteinen interagieren und RdRPs zu komplementären RNA Substraten führen. Dabei synthetisieren RdRPs im *guiding* Modus (D) *de novo* sekundäre siRNAs, wodurch diese eine 5'-Triphosphatgruppe aufweisen, wie es in *C. elegans* beobachtet wurde (Pak and Fire, 2007). Im *priming* Modus (E) fungiert ein Strang der primären siRNA dagegen als Primer für die Neusynthese von längeren dsRNA Molekülen durch RdRPs. Die entstandene dsRNA kann durch Dicer in sekundäre siRNAs prozessiert werden, welche dann chemisch identisch zu primären siRNAs sind (Colmenares et al., 2007; Moissiard et al., 2007).

Hierbei bilden drei Aminosäuren innerhalb der PIWI Domäne von Ago2, welche Ähnlichkeit mit katalytischen Domänen von Ribonukleasen der RNase H Familie aufweist, ein katalytisch aktives Zentrum (Parker et al., 2005; Song et al., 2004). Nach dieser initialen Spaltung können 5' mRNA Spaltprodukte ausgehend vom 3' Ende durch Exosomen und 3' mRNA Spaltprodukte ausgehend vom 5' Ende durch XRN1 abgebaut werden (Orban and Izaurralde, 2005). Abweichend von RISC in *Drosophila* zeigten *in vivo* und *in vitro* Studien der humanen

RISC Komponenten Dicer, TRBP und Ago2 die Bildung eines *RISC-loading complex* (RLC) auch in Abwesenheit von siRNAs. Dieser Komplex kann dsRNA zu siRNAs prozessieren und nach Abtrennung des *passenger* Strangs einen funktionell aktivierten RISC bilden (MacRae et al., 2008; Maniataki and Mourelatos, 2005).

5.2.3. RNA abhängige RNA Polymerasen (RdRPs)

Zellulär kodierte RNA abhängige RNA Polymerasen (RdRPs) sind in vielen eukaryotischen Organismen in RNA-vermittelte Genregulationsprozesse involviert und sind in einigen Organismen notwendig für einen funktionierenden RNAi Mechanismus (zusammengefasst in Tab. 5.1. bzw. Wassenegger and Krczal, 2006). Dabei vermitteln RdRPs die Synthese eines RNA Strangs komplementär zu einem einzelsträngigen RNA *Template*, wodurch ein Amplifikationsmechanismus durch RdRP abhängige Synthese von sekundären siRNAs entsteht. Basierend auf *in vivo* und *in vitro* Studien sowie *deep sequencing* Analysen konnten unterschiedliche Wirkmechanismen von RdRPs charakterisiert werden, die Primer-abhängig oder Primer-unabhängig sein können (vgl. Abb. 5.2. C–E).

Bereits bei der Entdeckung von RNAi in *C. elegans* postulierten Fire et al. eine amplifizierende Komponente in diesem Mechanismus (Fire et al., 1998), was in der Folge durch die Charakterisierung der RdRP EGO-1 bestätigt werden konnte (Smardon et al., 2000). Analysen von siRNAs nach *Silencing* eines Reportergens durch RNAi zeigten in *C. elegans*, dass diese nicht nur direkt im Sequenzbereich der injizierten dsRNA, sondern auch *upstream* im 5' Bereich vor dem primären Auslöser im Gen lokalisierten. Da diese siRNAs durch RdRP Aktivität entstanden sein mussten, wurden sie als sekundäre siRNAs bezeichnet. Weitere Experimente mit chimären *unc-22* / *gfp* Transgenen verdeutlichten, dass auch diese sekundären siRNAs *Silencing* auslösen können, was als transitives RNAi bezeichnet wird (Sijen et al., 2001). Da die Verteilung der sekundären siRNAs eine deutliche Polarität (von 5' → 3' auf dem *antisense* Strang) aufwies, wurde postuliert, dass ein Strang der primären siRNAs, welche aus der Prozessierung der injizierten dsRNA resultierten, als Primer auf der mRNA für RdRPs fungieren könnte. In diesem als *priming* Modus bezeichneten Wirkmechanismus würden durch RdRPs nachfolgend längere dsRNA Bereiche synthetisiert, welche durch Dicer zu sekundären siRNAs prozessiert würden (vgl. Abb. 5.2. E bzw. Sijen et al., 2001). Solche sekundären siRNAs, welche wie primäre siRNAs durch Dicer prozessiert werden, weisen eine 5'-Monophosphat- und eine 3'-Hydroxylgruppe auf (Elbashir et al., 2001b). Sekundäre siRNAs als *de novo* Produkte von RdRPs würden hingegen eine 5'-Triphosphatgruppe besitzen, wodurch in diesem Fall eine Unterscheidung zwischen primären

und sekundären siRNAs möglich ist. Klonierung und *deep sequencing* Analysen von siRNAs in *C. elegans* ergaben, dass nach der Auslösung von RNAi sekundäre siRNAs die überwiegende Mehrheit bildeten. Weiterhin zeigte sich, dass zur mRNA komplementäre sekundäre siRNAs hauptsächlich eine 5'-Triphosphatgruppe aufwiesen und vornehmlich *upstream*, aber auch *downstream* der primären siRNAs lokalisierten (Pak and Fire, 2007; Sijen et al., 2007). Dies widerlegte jedoch die Hypothese, wonach sekundäre siRNAs in *C. elegans* durch RdRP Aktivität im *priming* Modus entstehen. Daher wird derzeit davon ausgegangen, dass RdRPs durch primäre siRNAs und assoziierte Proteine zur Ziel mRNA gelenkt werden und dort *de novo* sekundäre siRNAs synthetisieren. Es wird angenommen, dass dabei ein „Schwing“-Mechanismus zum Tragen kommt in dem die RdRPs an der Bindungsstelle nicht fest verankert sind, sondern in einem begrenzten Bereich in 5' aber auch in 3' Richtung „schwingen“ und dort sekundäre siRNAs *de novo* synthetisieren. In diesem Wirkmechanismus, welcher als *guiding* Modus bezeichnet wird, ist jede sekundäre siRNA ein individuelles RdRP Produkt (vgl. Abb. 5.2. D bzw. Pak and Fire, 2007). In *C. elegans* wurde auch eine hohe Spezifität von RdRPs festgestellt. Umfassende *deep sequencing* Analysen endogener sekundärer siRNAs und mRNAs zeigten, dass durch EGO-1 eine Gruppe essentieller keimbahnspezifischer Gene post-transkriptionell reguliert wird (Maniar and Fire, 2011), während die Regulation von somaspezifischen Genen in Abhängigkeit von RRF-1 und RRF-3 erfolgt (Gent et al., 2010).

Die enzymatische Aktivität der zellulär kodierten RdRP QDE-1 aus *N. crassa* ist derzeit biochemisch am Besten charakterisiert. *In vitro* Studien zeigten, dass QDE-1 *de novo* und Primer-unabhängig an einer einzelsträngigen RNA Matritze sowohl lange dsRNA als auch 9 – 21 Nukleotide lange siRNAs synthetisiert (Abb. 5.2. C). Zusätzlich wurde eine Primer-abhängige Synthese von längeren dsRNA Molekülen beobachtet, jedoch mit deutlich reduzierter Effizienz (Makeyev and Bamford, 2002). Darüber hinaus konnte *in vitro* für QDE-1 eine DNA abhängige RNA Polymerase (DdRP) Aktivität und eine terminale Nukleotidyltransferase (TNTase) Aktivität an ssRNA und ssDNA (*single-stranded RNA* bzw. *DNA*) nachgewiesen werden (Lee et al., 2010). Die DdRP Aktivität von QDE-1 kann auch *in vivo* durch Schädigung der DNA ausgelöst werden, wobei eine QDE-1 abhängige Synthese aberranter RNAs (aRNAs) von ribosomalen DNA Sequenzen erfolgt. Diese aRNAs werden ebenfalls von QDE-1 zu dsRNA komplementiert, welche in der Folge durch Dicer Homologe zu siRNAs prozessiert werden können. Die entstehenden 20 – 21 nt langen siRNAs werden als qiRNAs bezeichnet und interagieren mit dem Argonauten Protein QDE-2 (Lee et al., 2009a). Da eine inhibierende Wirkung von qiRNAs auf die Translation von Proteinen

nachgewiesen wurde, sind diese vermutlich in die zelluläre Antwort nach DNA Schäden involviert (Lee et al., 2009a). Diese Entdeckungen verdeutlichen erstmalig die biologische Relevanz der DdRP Aktivität von RdRPs.

In *A. thaliana* erfolgt transitives *Silencing* in Abhängigkeit von RDR6, wobei unter bestimmten Voraussetzungen eine Primer-abhängige Synthese von sekundären siRNAs beobachtet werden kann (Moissiard et al., 2007). Auch wurde für diese RdRP *in vitro* DdRP und TNTase Aktivität, sowie eine Primer-unabhängige *de novo* Synthese längerer dsRNAs nachgewiesen, wobei die Reaktion durch *Cap*-Struktur oder polyA Schwanz am RNA *Template* nicht beeinflusst wurde (Curaba and Chen, 2008). Darüber hinaus konnte auch *in vitro* eine Primer-abhängige Synthese längerer dsRNAs hervorgerufen werden, deren Reaktionseffizienz im Vergleich zur *de novo* Synthese jedoch geringer ausfiel (Curaba and Chen, 2008). *In vivo* Studien der Synthese von tasiRNAs durch RDR6 (vgl. 5.3.1. bzw. Allen et al., 2005; Moissiard et al., 2007), Wirkmechanismen von Rdp-1 in *Schizosaccharomyces pombe* (vgl. 5.3.1. bzw. Motamedi et al., 2004) und Experimente mit Extrakten aus Weizenkeimlingen (Tang et al., 2003) verdeutlichen die biologische Relevanz einer RdRP Aktivität im *priming* Modus (zusammengefasst in Voinnet, 2008). Eine molekulare Kopplung von Doppelstrangsynthese durch RdRPs und Prozessierung dieser durch ein Dicer Homolog konnte für Rdp-1 in *S. pombe* nachgewiesen werden, wo eine *in vitro* Rekonstitution der Interaktion zwischen RDRC (*RNA-directed RNA polymerase complex*) und Dcr1 die RdRP Aktivität stimulierte (Colmenares et al., 2007). Auch konnte in *Tetrahymena thermophila* gezeigt werden, dass durch diesen Kopplungsmechanismus eine Spezifität von Dicer für dsRNA Moleküle mit 5'-Triphosphatrest erreicht wird (Lee and Collins, 2007).

In Vertebraten und Insekten konnten keine zellulär kodierten RdRP Homologe gefunden werden, jedoch wurde eine mögliche RdRP Aktivität für die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase beschrieben (Maida et al., 2009). Die humane Telomerase ist ein Ribonukleoproteinkomplex, welcher als zentrale Komponenten das hTERT Protein (*human telomerase reverse transkriptase*) und die *Template* RNA TERC (*telomerase RNA component*) enthält. Das hTERT Protein besitzt strukturelle Ähnlichkeiten zu viralen RdRPs und reversen Transkriptasen (Nakamura et al., 1997). Eine RdRP Aktivität von hTERT wurde bei Interaktion am RNA Substrat RMRP (*RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease*) festgestellt. Hierbei wird die Rückfaltung des 3' Endes von RMRP zu einer „Haarnadelstruktur“ (*back priming* Mechanismus) die Synthese des *antisense* Strangs von RMRP initiiert. Eine Dicer abhängige Prozessierung der entstehenden dsRNA zu siRNAs konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Maida et al., 2009).

Tab. 5.1.: RNA abhängige RNA Polymerasen (RdRPs) in verschiedenen Organismen.^a

Organismus	RdRP	Funktionen	Quellen
Pilze			
<i>S. pombe</i>	Rdp-1	TGS; PTGS	(Volpe et al., 2002); (Motamedi et al., 2004)
<i>N. crassa</i>	QDE-1	PTGS; qiRNAs	(Cogoni and Macino, 1999); (Makeyev and Bamford, 2002)
	Sad-1	MSUD	(Shiu et al., 2001);
	Rrp-3	unbekannt	(Shiu and Metzberg, 2002)
<i>M. circinelloides</i>	RdRP1	PTGS	(Nicolas et al., 2010)
	RdRP2	PTGS	(Calo et al., 2012)
Pflanzen			
<i>A. thaliana</i>	RDR1	PTGS	(Voinnet, 2008); (Yu et al., 2003)
	ADR2 (SMD1)	TGS; RdDM	(Xie et al., 2004); (Herr et al., 2005)
	ADR3 – ADR5	unbekannt	
	RDR6 (SDE1/SGS-2)	PTGS, tasiRNAs	(Dalmay et al., 2000b); (Moissiard et al., 2007)
Nematoden			
<i>C. elegans</i>	EGO-1	RNAi (Keimbahn)	(Smardon et al., 2000); (Maniar and Fire, 2011)
	RRF-1	RNAi (Soma)	(Aoki et al., 2007); (Gent et al., 2010)
	RRF-2	unbekannt	
	RRF-3	Inhibitor von RNAi	(Sijen et al., 2001); (Simmer et al., 2002)
Amöben			
<i>D. discoideum</i>	RrpA	RNAi	(Martens et al., 2002)
	RrpB	unbekannt	
	RrpC (DosA)	PTGS	diese Arbeit
Ciliaten			
<i>P. tetraurelia</i>	RDR1- RDR3	RNAi	(Marker et al., 2010)
	RDR4	unbekannt	
<i>T. thermophila</i>	Rdr1	RNAi	(Lee and Collins, 2007); (Lee et al., 2009b)
Säugetiere			
<i>H. sapiens</i>	hTERT	PTGS	(Maida et al., 2009)

^a Tabelle basierend auf (Maida and Masutomi, 2011; Wassenegger and Krczal, 2006).

RNAi, RNA Interferenz; TGS, *transcriptional gene silencing*; PTGS, *post-transcriptional gene silencing*; RdDM, *RNA-directed DNA methylation*; MSUD, *meiotic silencing by unpaired DNA*.

5.3. Biogenese und Funktionen kleiner regulatorischer RNAs

Basierend auf ihrer Biogenese, den biologischen Funktionen und ihren strukturellen Merkmalen können alle bisher in eukaryotischen Organismen entdeckten kleinen regulatorischen RNAs, welche 21 – 30 Nukleotide lang sind, in die drei Hauptgruppen siRNAs, miRNAs und piRNAs unterteilt werden, wobei letztere bisher nur in Tieren nachgewiesen wurden (zusammengefasst in Ghildiyal and Zamore, 2009).

Am Besten sind piRNAs bisher in *Drosophila* (Brennecke et al., 2007; Saito et al., 2006; Vagin et al., 2006) und Mäusen (Aravin et al., 2006; Girard et al., 2006; Grivna et al., 2006) untersucht worden. Die Biogenese von piRNAs unterscheidet sich jedoch deutlich von miRNAs und siRNAs (Brennecke et al., 2007; Gunawardane et al., 2007). Als hauptsächliche Funktion von piRNAs werden derzeit die posttranslationale Stilllegung von transposablen

Elementen während der Keimbahnentwicklung in Mammalia und *Drosophila* beschrieben (zusammengefasst in Siomi et al., 2011). Diese Gruppe von kleinen regulatorischen RNAs wurde bisher nicht in *Dictyostelium discoideum* nachgewiesen und wird daher im Folgenden nicht eingehender beschrieben.

Mit Ausnahme von piRNAs werden kleine regulatorische RNAs durch Dicer ähnliche Proteine aus längeren doppelsträngigen RNA Molekülen prozessiert. Nach Inkorporation in verschiedene Effektorproteinkomplexe können kleine regulatorische RNAs TGS und PTGS ihrer Zielgene vermitteln. Daneben können sie auch durch Schutz vor invasiven Nukleinsäuren, Chromatin Modellierung und Stilllegung von mobilen genetischen Elementen zur Genomstabilität beitragen. Als zentrale Komponenten in vielen Effektorproteinkomplexen wurden Argonauten Proteine mit diversen Funktionen identifiziert (zusammengefasst in Hutvagner and Simard, 2008; Ketting, 2011). Aufgrund von überlappenden und komplementären aber auch konkurrierenden Funktionen bilden regulatorische RNAs und deren Signalwege ein komplexes regulatorisches Netzwerk, welches in vielen Facetten derzeit unverstanden bleibt.

5.3.1. siRNAs

siRNAs sind gewöhnlich 21 – 25 Nukleotide lang und werden durch Dicer Homologe aus längeren dsRNA Molekülen, welche eine perfekte Basenkomplementarität aufweisen, prozessiert (vgl. Abschnitt 5.2.). Als Wirkmechanismen in Effektorproteinkomplexen können sie die Spaltung von mRNAs, translationale Repression, transkriptionelle Repression durch Chromatin und DNA Modifikation sowie DNA Elimination verursachen. Entsprechend ihres endogenen oder exogenen Ursprungs werden siRNAs in endo siRNAs (*endogenous* siRNAs) und exo siRNAs (*exogenous* siRNAs) unterteilt.

In Pflanzen aber auch in *Drosophila* wurden siRNAs viralen Ursprungs entdeckt (Aliyari et al., 2008; Molnar et al., 2005). Virale einzelsträngige RNA Moleküle können durch die Aktivität von viral oder zellulär kodierten RdRPs (z.B. RDR6 in *A. thaliana*) in dsRNAs überführt werden, die nachfolgend zu siRNAs prozessiert werden (zusammengefasst in Ding and Voinnet, 2007). Als weitere Quellen für exo siRNAs können artifiziell eingeführte siRNAs oder dsRNAs fungieren (zusammengefasst in Dykxhoorn et al., 2003). Zum Beispiel kann PTGS in *A. thaliana* durch Einführung von Transgenen ausgelöst werden. Auch hier erfolgt durch RDR6 die Synthese von dsRNAs. Die nachfolgende Prozessierung und Bindung der sekundären siRNAs an AGO1 führt zur spezifischen Spaltung der Ziel mRNAs (Luo and Chen, 2007). In Mammalia ist es nicht möglich RNAi durch Einführung von längeren

dsRNAs experimentell auszulösen, da hierdurch eine Aktivierung der Proteinkinase R (PKR) und der Interferon Signalwege verursacht wird. Nach Dimerisierung und Autophosphorylierung führt die Aktivierung von PKR zur Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF-2 α , welcher dann die Initiation der Proteinbiosynthese inhibiert (zusammengefasst in Stark et al., 1998). Durch direkte Transfektion von siRNAs oder Expression von *short hairpin* RNAs (shRNAs) ist es jedoch möglich, eine Interferon Antwort zu umgehen und so RNA Interferenz in Mammalia auszulösen (Elbashir et al., 2001a; Paddison et al., 2002).

Endo siRNAs wurden zunächst in Pflanzen (Hamilton et al., 2002) und *C. elegans* (Ambros et al., 2003) und nachfolgend auch in Mammalia (Yang and Kazazian, 2006) und *Drosophila* (Ghildiyal et al., 2008) entdeckt. Endo siRNAs von Zentromeren, Transposons und anderen repetitiven Sequenzen sind hierbei in die Stilllegung dieser genetischen Elemente involviert (zusammengefasst in Buhler and Moazed, 2007; Grewal, 2010). Längere dsRNA Vorläufermoleküle von endo siRNAs können aus bidirektionalen Transkripten von Retrotransposons (Yang and Kazazian, 2006), *hairpin* RNAs (Czech et al., 2008) oder Duplexe aus *antisense* Transkripten von Pseudogenen und komplementären mRNAs und anderen komplementären Transkripten (Ghildiyal et al., 2008; Okamura et al., 2008a; Okamura et al., 2008b) resultieren. Nach Prozessierung der dsRNA Präkursoren durch Dicer Homologe und Inkorporation der endo siRNAs in verschiedene Effektorproteinkomplexe, kann dies zu PTGS, TGS und der Remodellierung von Chromatinstrukturen führen. Als zentrale Komponente in diesen Effektorkomplexen wurden Argonauten Proteine identifiziert, welche durch *Slicer* Aktivität eine direkte Spaltung aber auch indirekt durch Rekrutierung weiterer Interaktionspartner den Abbau von Zielsequenzen einleiten. (zusammengefasst in Carthew and Sontheimer, 2009; Ghildiyal and Zamore, 2009).

In Pflanzen aber auch in *S. pombe* übernehmen RdRPs zusätzlich eine zentrale Funktion in der Biogenese der dsRNA Vorläufermoleküle und von endo siRNAs. Gut untersuchte Beispiele hierfür sind *natural-antisense* siRNAs (Borsani et al., 2005; Katiyar-Agarwal et al., 2006), *trans-acting* siRNAs (Peragine et al., 2004; Vazquez et al., 2004) und *cis-acting* siRNAs (Xie and Qi, 2008; Zilberman et al., 2003) in *A. thaliana*. *Natural-antisense* siRNAs (natsiRNAs) resultieren aus der Prozessierung von überlappenden *sense* und *antisense* Transkripten. In *A. thaliana* z.B. verursacht Salzstress die Expression eines *antisense* Transkripts, welches eine teilweise Komplementarität zu einer konstitutiv exprimierten mRNA ausweist. Durch DCL2 und RDR6 kann die entstehende dsRNA zu natsiRNAs prozessiert werden, welche nachfolgend den Abbau der mRNA vermitteln (Borsani et al.,

2005). *Trans-acting* siRNAs (tasiRNAs) entstehen aus längeren nicht proteinkodierenden Transkripten spezifischer TAS Gene. Diese Transkripte werden zunächst durch AGO1 mit assoziierten miRNAs, die Spezifität vermitteln, gespalten. Diese Spaltung induziert nachfolgend die Synthese von dsRNA im *priming* Modus durch RDR6, welche dann durch DCL4 zu tasiRNAs prozessiert werden, die nachfolgend *in trans* zur Spaltung ihrer komplementären mRNAs führen können (Allen et al., 2005; Vazquez et al., 2004). *Cis-acting* siRNAs (casiRNAs, auch als *repeat-associated* siRNAs bezeichnet) resultieren aus Transkripten von genomischen *tandem repeat* Sequenzen, Transposons und repetitiven Elementen, welche durch die pflanzenspezifische Polymerase IV transkribiert werden (Herr et al., 2005; Onodera et al., 2005). Diese Transkripte werden, nach Synthese des komplementären Strangs durch RDR2 von DCL3 zu siRNAs prozessiert. CasiRNAs werden nachfolgend durch HEN1 am 3' Ende methyliert. Nach Bindung an Argonauten Proteine (AGO4 oder AGO6) vermitteln sie durch RdDM (*RNA-directed DNA methylation*) und Histonmodifikationen die Formation von Heterochromatin im Bereich ihres Ursprungs (zusammengefasst in He et al., 2011; Xie and Qi, 2008).

In *S. pombe* sind endo siRNAs von perizentromerischen Bereichen, Telomeren und dem *mating-type* Locus für die Bildung von Heterochromatin in diesen Bereichen essentiell (zusammengefasst in Grewal, 2010). Primäre siRNAs, die aus der Prozessierung von bidirektionalen Transkripten durch das Dicer Homolog Dcr1 entstehen können, werden hierbei zunächst im RITS Komplex (*RNA-induced transcriptional silencing complex*) durch das Argonauten Protein AGO1 gebunden. Dieser Proteinkomplex assoziiert an entstehende Transkripte, welche Komplementarität zur gebunden siRNA aufweisen. Zusätzlich bindet das Chromodomänen Protein Chp1 im RITS Komplex an Methylierungen von Lysin9 am Histon3 (Verdel et al., 2004). Zur Formation von Heterochromatin werden in der Folge durch RITS weitere Proteinkomplexe rekrutiert. Die Methyltransferase Clr4 assoziiert mit den Proteinen Rik1, Dos1, Dos2 und Pcu4/Cul4 zum Clr4-Rik1-Cul4 Komplex (ClrC) (Hong et al., 2005; Horn et al., 2005; Jia et al., 2005; Thon et al., 2005). Die Rekrutierung von ClrC, über das Linker-Protein Stc1, führt zur Methylierung von Lysin9 am Histon H3 durch Clr4 (Bayne et al., 2010; Zhang et al., 2008). Durch Rekrutierung des RDRC wird die Synthese von sekundären siRNAs und dadurch eine Ausbreitung von Heterochromatin bewirkt. Der RDRC enthält neben dem RdRP Homolog Rdp1 eine putative Helicase Hrr1 und ein Mitglied der poly(A) Polymerase Familie Cid12 (Motamedi et al., 2004). Der RDRC vermittelt die Synthese von längeren dsRNA Molekülen anhand primärer Transkripte durch Rdp1 und die Prozessierung dieser durch Dcr1 zu sekundären siRNAs, welche dann erneut von AGO1

gebunden werden können (Sugiyama et al., 2005). C-terminale Bereiche von Dcr1 interagieren hierbei mit dem RDRC, wodurch die Synthese von dsRNA durch Rdp1 forciert wird, was darauf hindeutet, dass Synthese von dsRNA und Prozessierung dieser zu siRNAs gekoppelte Prozesse sind (Colmenares et al., 2007).

5.3.2. miRNAs

Die erste miRNA *lin-4* wurde in *C. elegans* bei der Untersuchung von postembryonalen Entwicklungsdefekten entdeckt. *Lin-4* wurde in diesen Studien als Negativregulator für die Proteinmenge von LIN-14 während des ersten Larvalstadiums charakterisiert (Lee et al., 1993). Vor allem durch *deep sequencing* Analysen wurden in der Folge in verschiedensten Organismen eine enorme Anzahl putative miRNAs entdeckt. Derzeit werden in der miRBase Datenbank (Griffiths-Jones et al., 2008) z.B. für humane Zellen 1921, für *D. melanogaster* 430, für *C. elegans* 368 oder für *A. thaliana* 328 putative miRNAs aufgeführt (Angaben nach miRBase; Stand 04/2012). Polycistronische Transkripte von intergenischen Regionen (Tanzer and Stadler, 2004), Introns und nicht kodierende RNAs wie *small nucleolar RNAs* (Ender et al., 2008; Saraiya and Wang, 2008) können als Quellen für primäre Transkripte von miRNAs (pri-miRNAs) dienen. Diese werden durch Polymerase II (Lee et al., 2004a) aber auch durch Polymerase III (Borchert et al., 2006) transkribiert. Pri-miRNAs variieren in ihrer Länge zwischen einigen hundert und einigen tausend Nukleotiden und können durch *Cap*-Struktur und polyA Schwanz vor Degradation geschützt werden (Bracht et al., 2004; Cai et al., 2004). Charakteristisch für miRNAs, sowohl in Pflanzen als auch in Tieren, ist deren zweistufige Biogenese durch Dicer und Drosha Proteine mit assoziierten dsRNA bindenden Proteinen (zusammengefasst in Kim, 2005). Hierbei werden aus pri-miRNAs zunächst ca. 60 – 70 Nukleotide lange Präkursoren, die als pre-miRNAs bezeichnet werden und eine *stem loop* Sekundärstruktur bilden, prozessiert. Die doppelsträngigen „*stem*“ Bereiche zeigen jedoch im Gegensatz zu Vorläufermolekülen von siRNAs keine vollständige Basenkomplementarität. Im zweiten Prozessierungsschnitt werden pre-miRNAs zu reifen miRNAs mit einer Länge zwischen 20 – 23 Nukleotiden, prozessiert (Lee et al., 2003; Lee et al., 2002).

In Tieren erfolgt die Prozessierung von pre-miRNAs im Zellkern in einem Multiproteinkomplex bestehend aus Drosha mit den assoziierten dsRNA bindenden Proteinen Pasha in *D. melanogaster* und *C. elegans* bzw. DGCR8 in humanen Zelllinien (Denli et al., 2004; Han et al., 2004). Pre-miRNAs werden nach Bindung an das nukleäre Exportprotein Exportin-5, welches eine dsRBD enthält, aktiv in einem GTP-abhängigen Prozess aus dem Zellkern ins Cytoplasma transportiert (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). Im Cytoplasma

erfolgt schließlich durch Dicer Homologe und assoziierte dsRBD Proteine (TRBP in humanen Zelllinien, LOQS in Fliegen) die Prozessierung reifer miRNAs aus den doppelsträngigen „*stem*“ Bereichen von pre-miRNAs (Chendrimada et al., 2005; Forstemann et al., 2005). Alternativ hierzu können miRNAs in Tieren auch aus der Prozessierung von Introns resultieren und werden dann als *mitrons* bezeichnet. Pre-miRNAs werden hierbei durch die Aktivität der *splicing* Maschinerie unter Beteiligung von *lariat-debranching* Enzymen generiert. Die weitere Biogenese zu reifen miRNAs verläuft analog zu anderen pre miRNAs (Okamura et al., 2007).

In Pflanzen erfolgen die beiden Prozessierungsschritte von pri-miRNAs zu reifen miRNAs im Zellkern durch das Dicer Homolog DCL-1 mit assoziiertem dsRBD Protein HYL1. Nach Methylierung der miRNAs durch die Methyltransferase HEN1 werden diese durch das Exportin-5 Homolog HASTY in das Cytoplasma exportiert (zusammengefasst in Voinnet, 2009). Abweichend von diesen kanonischen Prozessierungswegen für miRNAs wurden zahlreiche alternative Wege beschrieben (zusammengefasst in Miyoshi et al., 2010).

Aufgrund der Prozessierung durch Dicer-ähnliche Proteine zeigen miRNAs wie siRNAs charakteristische 2 Nukleotide lange Überhänge an jedem 3' Ende (Elbashir et al., 2001b; Zamore et al., 2000). Nach Bindung von miRNAs an Argonauten in Effektor Ribonukleoprotein (RNP) Komplexen wie z.B. RISC wird ein Strang des miRNA Duplexes, welcher als miRNA* oder *passenger* Strang bezeichnet wird, abgebaut. Der verbleibende Strang wird als *guiding* Strang bezeichnet (Gregory et al., 2005; Maniataki and Mourelatos, 2005). Ähnlich wie bei siRNAs wird auch bei miRNAs aufgrund der thermodynamischen Stabilität des 5' Endes zwischen miRNA und miRNA* unterschieden (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Abweichend hiervon können jedoch auch miRNA* Stränge in Effektorkomplexe inkorporiert werden und regulatorische Funktionen übernehmen (Okamura et al., 2008c).

Abgesehen von einigen Ausnahmen binden miRNAs in Tieren nach Inkorporation in Effektor RNP Komplexe an die 3' untranslatierte Region (3' UTR) von Ziel mRNAs (Lewis et al., 2003). Hierbei zeigen miRNAs nur eine partielle Komplementarität zu ihren Zielsequenzen, welche jedoch im Bereich der konservierten *seed* Sequenz keine Fehlpaarungen aufweist. Die konservierte *seed* Sequenz umfasst die Nukleotide 2 – 8 am 5' Ende der miRNA (zusammengefasst in Bartel, 2009). Aufgrund dieser kurzen *seed* Sequenz können durch eine miRNA viele verschiedene Ziel mRNAs reguliert werden (Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008). Auch sind *seed* Sequenzen von miRNAs in Tieren oftmals evolutionär konserviert, woraus sich miRNA Familien ableiten lassen (Grimson et al., 2008; Lewis et al., 2005). In

Pflanzen hingegen vermitteln miRNAs in Effektor RNP Komplexen die Bindung an die kodierende Sequenz der Ziel mRNAs und zeigen hierbei eine nahezu vollständige oder sogar vollständige Komplementarität zur Zielsequenz (zusammengefasst in Voinnet, 2009).

miRNA RNP Komplexe können die Expression von Genen durch translationale Repression, Regulation der mRNA Stabilität sowie durch direkte Spaltung von mRNAs regulieren (zusammengefasst in Huntzinger and Izaurralde, 2011). Hierbei kann eine Regulation der Translation sowohl vor als auch nach Initiation der Polypeptidkettensynthese erfolgen. Blockade des translationalen Initiationskomplexes (Humphreys et al., 2005; Kiriakidou et al., 2007; Meister, 2007; Pillai et al., 2005), Repression der translationalen Elongation (Maroney et al., 2006; Petersen et al., 2006; Seggerson et al., 2002), aber auch Abbau von naszierenden Polypeptidketten (Nottrott et al., 2006) wurden als mögliche Wirkmechanismen hierfür beschrieben. Eine Destabilisierung von mRNAs durch Effektor RNP Komplexe kann durch Entfernung der *Cap*-Struktur (Behm-Ansmant et al., 2006; Rehwinkel et al., 2005) und / oder Deadenylierung (Giraldez et al., 2006; Wu et al., 2006) erfolgen. Als eine essentielle Komponente für diese Prozesse konnten Proteine der GW182 Familie, welche mit Argonauten Proteinen interagieren, identifiziert werden (zusammengefasst in Eulalio et al., 2009). Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass die Destabilisierung von mRNAs der hauptsächliche Wirkmechanismus von miRNAs in Tieren sein könnte, wobei jedoch derzeit unklar ist, ob der Abbau von mRNAs als Konsequenz von translationaler Repression erfolgt oder einen eigenständigen Mechanismus dargestellt (Baek et al., 2008; Guo et al., 2010; Selbach et al., 2008). In Verbindung mit diesen Prozessen stehen besondere cytoplasmatische Strukturen, welche als *processing bodies* (*P-bodies*) bezeichnet werden. In *P-bodies* wurden Proteine die in translationale Repression und mRNA Abbau involviert sind, aber auch Komponenten der RNAi Maschinerie identifiziert. In ihnen vollziehen sich daher zentrale Prozesse des mRNA Umsatzes in einer Zelle, wie Deadenylierung, Abbau und Speicherung aber auch translationale Repression durch miRNAs. Eine Translokation von miRNA RNP Komplexen in *P-bodies* kann hierbei durch GW182-Proteine vermittelt werden (zusammengefasst in Eulalio et al., 2009; Kulkarni et al., 2010).

Vor allem in Pflanzen (Llave et al., 2002; Rhoades et al., 2002) aber auch Tieren (Liu et al., 2004; Meister, 2007) können miRNAs auch eine direkte Spaltung von Ziel mRNAs durch Argonauten Homologe mit *Slicer* Aktivität hervorrufen. Studien deuten jedoch auch hier darauf hin, dass in Pflanzen translationale Repression ein verbreiteter Wirkmechanismus von miRNAs ist (Brodersen et al., 2008; Lanet et al., 2009).

5.4. Strukturelle und biochemische Eigenschaften von RdRPs

RdRPs katalysieren die Bildung von 3' – 5' Phosphodiesterbindungen zwischen Ribonukleotiden komplementär zu und an einer RNA Matrice. Ursprünglich wurden sie in RNA Viren wie z.B. Polioviren entdeckt (Baltimore et al., 1963). Virale RdRPs sind auf dem Genom der Viren kodiert und für deren Replikation und Transkription essentiell (zusammengefasst in Ahlquist, 2002; Ng et al., 2008). Strukturell gleichen virale RdRPs retroviralen reversen Transkriptasen, welche in Kristallstrukturen die typische Form einer geschlossen rechten Hand zeigen. Diese wird aus den sogenannten Finger-; Daumen- und Handflächen-Domänen gebildet. Obwohl virale und kernkodierte RdRPs nur geringe Sequenzhomologie aufweisen, besitzen sie funktionelle Gemeinsamkeiten wie Amplifikation von mRNAs und interzelluläre Ausbreitung dieser Produkte (Ahlquist, 2002). Zellulär kodierte RdRPs beinhalten wie DNA abhängige RNA Polymerasen (DdRPs) als katalytisches Zentrum eine *double-psi β-barrel* (DPBB) Domäne (Iyer et al., 2003). DPBB Domänen beinhalten das Signaturmotif DxDGD, welches zweiwertige Metallionen koordinieren kann und das katalytisch aktive Zentrum bildet (Steiz, 1998). Punktmutationen innerhalb dieses Motifs führten bei QDE-1 (Makeyev and Bamford, 2002), Rdp-1 (Sugiyama et al., 2005) und RDR6 (Curaba and Chen, 2008) zum Verlust der katalytischen Aktivität. In Kristallstrukturen von QDE-1 ΔN (Aminosäuren 376 - 1402) liegt das Protein als Dimer vor, wobei jede Untereinheit ein katalytisches Zentrum formiert (vgl. Abb. 5.3.). In diesen wird eine katalytische Spalte zwischen den beiden DPBB Subdomänen (DPBB 1 und DPBB 2) ausgebildet, wobei in der zweiten Subdomäne die drei vorhergesagten katalytischen Asparaginsäuren-Reste lokalisiert sind (Salgado et al., 2006).

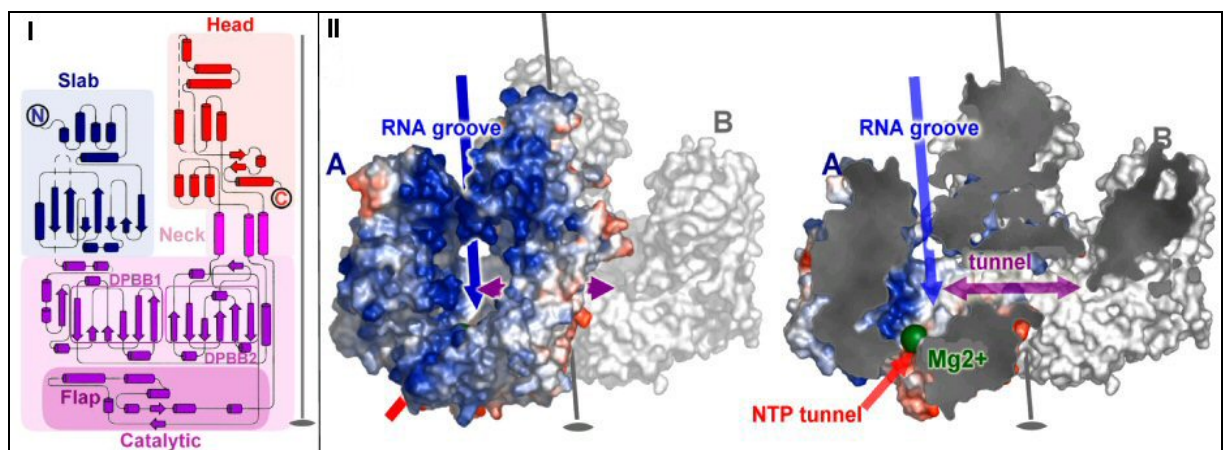


Abb. 5.3.: Struktur von QDE-1 ΔN I: Topologie der QDE-1 ΔN Dimer-Untereinheit. Farben entsprechen den Domänen: Slab blau; katalytisches Zentrum mit den Subdomänen DPBB1, DPBB2 und Flap violett; Neck pink; Head rot. II: Kristallstruktur von QDE-1 ΔN Dimer-Untereinheit A. Graue Linie markiert die relative Lage, der nicht in der Kristallstruktur vorliegenden Untereinheit B. Blauer Pfeil markiert vorhergesagte RNA Produkt Furche; Roter Pfeil markiert den postulierten NTP Tunnel; Violetter Pfeil markiert den Tunnel, welcher die katalytischen Zentren im Dimer verbinden könnte; Mg²⁺ Ionen sind als grüne Kugel dargestellt; links Aufsichtsbild; rechts Schnittbild (Abb. aus Salgado et al., 2006).

5.5. RNAi und RdRPs in *Dictyostelium discoideum*

RNA-vermittelte Genregulation durch endogene *antisense* RNAs wurde in *D. discoideum* bereits Anfang der 1990er Jahre bei der Untersuchung des *psvA* Gens entdeckt (Hildebrandt and Nellen, 1992). Darüber hinaus konnte die Funktionalität von RNAi in *D. discoideum* durch artifizielle Stilllegung von Endo- und Transgenen *in vivo* durch Expression einer sequenzhomologen *hairpin* RNA nachgewiesen werden (Martens et al., 2002). Homologe von Proteinen mit zentralen Funktionen im RNAi Mechanismus konnten ebenfalls im Genom von *D. discoideum* identifiziert werden (Cerutti and Casas-Mollano, 2006).

Darunter befinden sich fünf Argonauten Homologe AgnA – AgnE, die der PIWI Unterfamilie zugeordnet werden können (Cerutti and Casas-Mollano, 2006) und ein verkürztes Homolog AgnF, welches lediglich eine PAZ Domäne beinhaltet (Hinas et al., 2007). Analysen der putativen RNA-Helicase HelF identifizierten diese als Suppressor von RNAi in *Dictyostelium*, da ein *knock out* von *helF* zu einem effizienteren *Silencing* von Genen bei Expression einer sequenzhomologen *hairpin* RNA führte (Popova et al., 2006). Weiterhin wurden im Genom 2 Gene identifiziert, welche für die Dicer-ähnlichen Proteine *drnA* und *drnB* kodieren. Diese beinhalten als konservierte Domänen eine N-terminal lokalisierte dsRBD und zwei C-terminal lokalisierte Ribonuklease III Domänen (Martens et al., 2002). Aufgrund der fehlenden ATPase/Helicase, PAZ und DUF Domäne unterscheiden sie sich strukturell deutlich von Dicer Proteinen und zeigen eher Homologie zu Drosha Proteinen in anderen Organismen (Jaskiewicz and Filipowicz, 2008). Eine Prozessierung von dsRNA in ca. 25 nt lange Fragmente wurde auch *in vitro* nach partieller Aufreinigung eines 450 kDa großen Multiproteinkomplexes gezeigt (Novotny et al., 2001).

Darüber hinaus wurden im Genom von *D. discoideum* 3 Gene identifiziert werden, welche für die RdRPs *rrpA*, *rrpB* und *rrpC* kodieren. Die genomische Sequenz von *rrpA* ist 7336 bp, von *rrpB* 7308 bp und von *rrpC* 6962 bp lang, wobei sich die Sequenzen von RrpA und RrpB nur in 49 Aminosäuren unterscheiden (weniger als 3%). Alle drei RdRPs beinhalten neben der konservierten RdRP Domäne zusätzlich eine N-terminal lokalisierte DExH Box Helicase Domäne, welche eine hohe Ähnlichkeit zu Helicase Domänen in Dicer Homologen von *C. elegans* und *D. melanogaster* aufweist. (vgl. Abb. 5.4. bzw. Martens et al., 2002). Aus der Abwesenheit einer Helicase Domäne in DrnA und DrnB und ihrer Anwesenheit in RdRP Homologen resultierte die Hypothese, dass möglicherweise ein „Domänen Tausch“ zwischen diesen Proteinklassen in *D. discoideum* stattgefunden haben könnte (Martens et al., 2002). Diese Hypothese impliziert eine mögliche Interaktion zwischen RdRPs und Dicer-ähnlichen Proteinen im RNAi Mechanismus von *Dictyostelium*, wie es für RdRP und Dicer Homologe

in *S. pombe* beschrieben wurde (Colmenares et al., 2007). Ein Sequenzvergleich der DPBB Domäne innerhalb der RdRP Domäne von RrpA, RrpB und RrpC mit DPBB Domänen aus biochemisch gut charakterisierten RdRPs von anderen Organismen, zeigte eine sehr hohe Ähnlichkeit der Domänen und das Vorhandensein des Signaturmotifs DxDGD (Abb. 5.5.).

Gezielte *knock outs* von *rrpA*, *rrpB* und *rrpC* mittels homologer Rekombination zeigten, dass nur *rrpA* *in vivo* essentiell für eine artifizielle Stilllegung von Endo- und Transgenen durch RNAi ist (Martens et al., 2002). Untersuchungen der häufig im Genom von *D. discoideum* vorkommenden LTR Retrotransposons DIRS-1 und Skipper deuten darauf hin, dass diese sowohl durch DNA Methylierung als auch durch RNAi-vermittelte Mechanismen reguliert werden (Hinas et al., 2007; Kuhlmann et al., 2005). So wurden in cDNA Bibliotheken kleiner RNAs (18 – 26 nt) aus *Dictyostelium* siRNAs identifiziert, welche von DIRS-1 und Skipper abstammten (Hinas et al., 2007; Details siehe Abschnitt 9.5.). Dabei repräsentierten DIRS-1 spezifische Sequenzen den größten Anteil und lagen sowohl in *sense* als auch in *antisense* Orientierung vor. Die DIRS-1 siRNAs wiesen hauptsächlich 5'-Monophosphatreste auf, aber auch siRNAs mit 5'-Triphosphatrest konnten detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass sowohl Dicer-ähnliche Proteine als auch RdRPs in die Biogenese der DIRS-1 spezifischen siRNAs involviert sind (Hinas et al., 2007). Zusätzlich konnten zwei putative miRNAs (mica1190 und mica1198) identifiziert werden, deren Biogenese von *drnB* abhängig ist (Hinas et al., 2007).

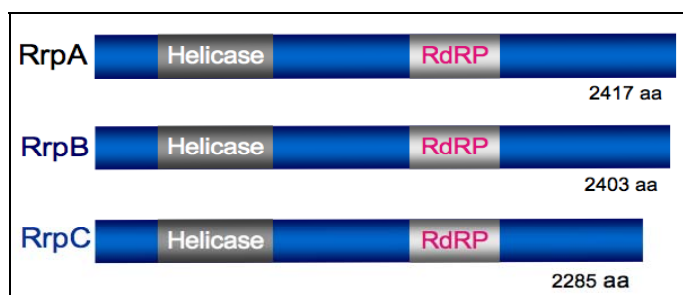


Abb. 5.4.: Domänenstruktur der RNA abhängigen RNA Polymerasen (RdRPs) in *D. discoideum*. RrpA, RrpB und RrpC beinhalten eine N-terminale Helicase Domäne und eine in der zweite Hälfte der Sequenz lokalisierte RdRP Domäne. Die Größe der Proteine in Aminosäuren (aa) ist unterhalb angegeben. (Abb. nach C. Hammann, unveröffentlicht).

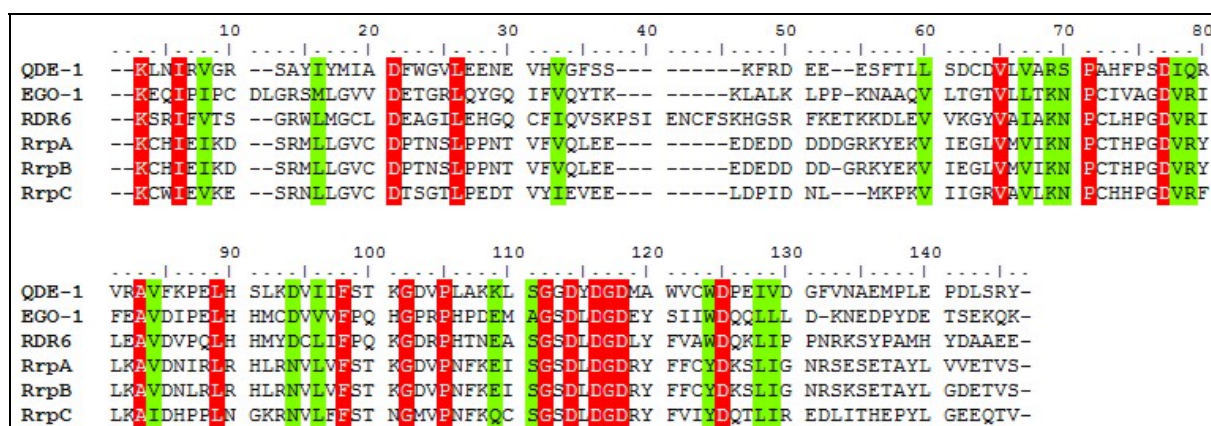


Abb. 5.5.: Alignment der Aminosäuresequenz von DPBB Domänen in RdRPs mit ClustalW. Darstellung umfasst DPBB Domänen von QDE-1 aus *N. crassa*, EGO-1 aus *C. elegans*, RDR6 aus *A. thaliana* sowie RrpA, RrpB und RrpC aus *D. discoideum*. Rot markiert sind identische Aminosäuren und konservative Substitutionen sind grün hinterlegt (Abb. basierend auf Ng et al., 2008).

5.6. *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

Dictyostelium discoideum wurde 1935 erstmalig von K.B. Raper beschrieben (Raper, 1935) und wird derzeit in die Klasse der Amoebozoa eingeordnet (zusammengefasst in Romeralo et al., 2012). Den natürlichen Lebensraum von *D. discoideum* bilden Waldböden, in denen sich der einzellige eukaryotische Organismus von Laub zersetzenden Bodenbakterien und Hefen ernährt und sich mittels Pseudopodien amöboid fortbewegen kann.

Bei ausreichendem Nahrungsangebot vermehrt sich *D. discoideum* vegetativ. Bei Nahrungsmangel hingegen wird ein 24-stündiger Entwicklungszyklus zu einem multizellulären Stadium durchlaufen, wobei Sporen als Überdauerungsform ausgebildet

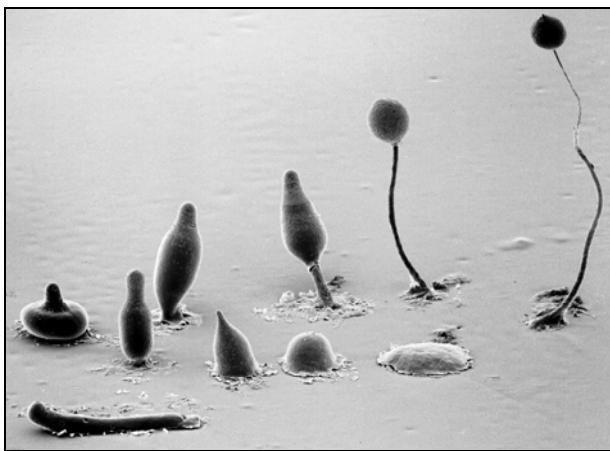


Abb. 5.6. Der Entwicklungszyklus von *D. discoideum*
© M.J. Grimson and R.L. Blanton; Biological Sciences
Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University.

werden (vgl. Abb. 5.6. bzw Loomis, 1975). Während des vegetativen Wachstums wird permanent das Verhältnis zwischen eigener Zelldichte und dem verfügbaren Nahrungsangebot durch Sekretion des Glykoproteins PSF (*prestarvation factor*) bestimmt (Clarke et al., 1988). Überschreitet dieses Verhältnis einen kritischen Schwellenwert, führt dies zur Sekretion von cAMP als Hungersignal, wodurch der Entwicklungszyklus

eingeleitet wird (Gerisch and Malchow, 1976). Durch den entstehenden cAMP Konzentrationsgradienten aggregieren ca. $10^5 - 10^6$ Zellen zu einem Pseudoplasmodium, welches auch als „*mound*“ bezeichnet wird. Diese multizellulären Aggregate elongieren in der Folge zu „*slugs*“, welche sich chemo- und phototaktisch fortbewegen können, um einen optimalen Sporenstandort zu erreichen. In dieser Phase differenzieren anterior ca. ein Fünftel der Zellen zu Prästielzellen, während sich posterior ca. vier Fünftel zu Präsporenzellen entwickeln (Gomer and Firtel, 1987; Weijer et al., 1984). In der weiteren Entwicklung runden sich die „*slugs*“ ab und bilden eine Struktur, welche als „*mexican hat*“ bezeichnet wird. Während der Kulmination wandern Prästielzellen durch die Zellmassen der Präsporenzellen hindurch und vakuolisieren. Durch den entstehenden Tugor werden die Präsporenzellen empor gedrückt. Am Ende dieser Entwicklung hat sich ein kompletter Fruchtkörper, bestehend aus abgestorbenen Stielzellen und überdauerungsfähigen Sporenzellen, entwickelt. Aus diesen entwickeln sich unter günstigen Nahrungs- und Umweltbedingungen wieder vegetativ lebende Amöben (zusammengefasst in Kessin, 2001; Shaulsky and Kessin, 2007).

Im Jahr 2005 wurde das vollständig sequenzierte Genom von *D. discoideum* veröffentlicht (Eichinger et al., 2005). Das ca. 34Mb große haploide Genom von *D. discoideum* verteilt sich auf 6 Chromosomen mit ca. 12500 vorhergesagten proteinkodierenden Genen und ein 88 kB großes extrachromosomales Palindrom, welches die rRNA Gene enthält. (Eichinger et al., 2005). Weitere Merkmale sind, dass trotz eines relativ kompakten Genoms dieses zu rund 10% aus repetitiven Elementen besteht und einen relativ hohen A / T Gehalt von fast 80% aufweist (Glockner et al., 2001; Glockner et al., 2002). Hierbei sind die LTR Retransposons DIRS-1 und Skipper die am Häufigsten vorkommenden repetitiven Elemente im Genom von *D. discoideum* (Glockner et al., 2001; Details siehe Abschnitt 9.5.).

D. discoideum ist als eukaryotischer, leicht transformierbarer Organismus mit haploidem Chromosomensatz, der zudem einen spezifischen Entwicklungszyklus durchläuft, ein etablierter Modellorganismus für verschiedenste genetische, zellbiologische und molekularbiologische Untersuchungen (zusammengefasst in Gaudet et al., 2007; Urushihara, 2008). In *D. discoideum* können Gene mittels homologer Rekombination unterbrochen oder vollständig deletiert werden (De Lozanne and Spudich, 1987; Witke et al., 1987). Zusätzlich wurden kürzlich Serien von extrachromosomalen Überexpressionsvektoren (Veltman et al., 2009a; Veltman et al., 2009b) und integrierenden Überexpressionsvektoren (Dubin and Nellen, 2010) mit unterschiedlichen Protein-*Tags* veröffentlicht, welche durch ihren modularen Aufbau eine effiziente Klonierung von Genen ermöglichen.

6. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von RNA abhängigen RNA Polymerasen aus *Dictyostelium discoideum*. Hierzu sollten zunächst RdRP Deletionsstämme in allen möglichen Kombinationen mit einer vollständigen Deletion von Helicase und RdRP Domäne generiert werden. Eine nachfolgende Entfernung des Selektionsmarkers aus diesen Stämmen musste ebenfalls erfolgen, um diese in den neu entwickelten Reportersystemen analysieren zu können. Die Herstellung von RdRP Deletionsstämmen wurde erforderlich, da mit dem im Vorfeld dieser Arbeit erstellten RdRP *knock out* Vektoren keine vollständige Deletion der funktionellen Domänen erreicht werden konnte. Hierbei sollte am Beispiel der RdRPs eine effizientere Methode zur Herstellung von Gendeletionsvektoren etabliert werden. Basierend auf dem StarGate[®]-*combinatorial cloning* System der Firma IBA (Göttingen) und dem pLBLP Vektor (Faix et al., 2004), war ein Ziel dieses Projekts, die Etablierung und Validierung eines organismenspezifischen Akzeptor Systems, welches die Generierung von Gendeletionsvektoren in einer Einschritt-Reaktion ermöglicht.

In vorherigen Studien konnten bereits erste Hinweise auf einen RNA-vermittelten Stilllegungsmechanismus für die LTR Retrotransposons DIRS-1 und Skipper aufgezeigt werden (Hinas et al., 2007; Kuhlmann et al., 2005). Daher sollten mögliche Änderungen der Expression von DIRS-1 und Skipper in den neu erstellten RdRP Deletionsstämmen untersucht werden. Methodisch sollte dies in Northern Blot Analysen zum Nachweis längerer Transkripte und siRNAs sowie durch *deep sequencing* Analysen, erfolgen.

Eine genauere Charakterisierung der Wirkmechanismen von RdRPs im RNAi Mechanismus von *D. discoideum* erforderte die Entwicklung von neuen Reportersystemen, da das zunächst verwendete Discoidin Reportersystem, welches von H. Martens entwickelt wurde (Martens et al., 2002), keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferte. Die Neukonzeption dieser Reportersysteme sah eine artifizielle Stilllegung eines Endogens und eines Transgens durch Expression von *hairpin*, *antisense* und *sense* RNA Konstrukten vor.

In weiteren Projekten sollte durch qRT-PCR Analysen eine relative Quantifizierung der Expression der RdRPs während der Entwicklung erfolgen. Des Weiteren wurde zur Herstellung von RdRP Überexpressionszelllinien für Lokalisationsstudien und zur Aufreinigung möglicher Interaktionspartner eine Klonierung der RdRPs in einen Expressionsvektor der pDneo2a Serie (Dubin and Nellen, 2010) angestrebt.

7. Materialien

7.1. Geräte und Apparaturen

Autoklav (3870 ELVC)	Tuttnauer, Wesel
Binokular	Zeiss, Jena
Blotting-Apparaturen:	
PAA-Gele (Trans-Blot Cell 170-3949)	Biorad, München
PAA-Gele, Proteingele (Fastblot B33)	Biometra, Göttingen
Proteingele (XCell II™ Blot Module)	Invitrogen, Karlsruhe
Brutschrank	Memmert, Schwabach
Coulter Counter Modell ZM	Coulter Electronics, Krefeld
Elektrophorese-Kammern:	
Agarosegele	Metallwerkstatt, Universität Kassel
Agarosegele (Mupid®One)	Advance Co., LTD Japan
PAA-Gele	Metallwerkstatt, Universität Kassel
Proteingele (SE 250)	Hoefer Pharmacia, SF, USA
Proteingele (Xcell-SureLock™-Mini-Cell)	Invitrogen, Karlsruhe
Elektroporator (ECM 630)	BTX Harvard Apparatus, Holliston, USA
Feinwaage (1413 MP8)	Sartorius, Göttingen
Geldokumentation	Intas, Göttingen
Geigerzähler (Mini-Monitor)	Mini-Instruments, GB
Heizblöcke:	
Accu Block Digital Dry Bath	LabNet International, Edison, USA
Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Hybridisierungsöfen:	
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroliter-Pipetten Discovery Comfort (10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Abimed, Langenfeld
Mikrowelle (Lunik 250)	Aldi, Essen
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim/Main
PCR-Maschinen:	
FlexCycler	Analytik Jena, Jena

Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler ep realplex	Eppendorf, Hamburg
Primus 25 advanced [®]	PEQLAB, Erlangen
pH-Meter (HI 221)	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Photometer:	
BioPhotometer plus	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Fisher Scientific, Schwerte
Phospho Imager (FLA-5000)	Fujifilm, Düsseldorf
Pipettierhelfer (Accu-Jet [®])	Brand, Wertheim
Rollinkubator	Schütt, Göttingen
Schüttler:	
Kulturschüttler	Infors AG, Bottmingen
Kulturschüttler (Laboshake RO 500)	Gerhardt, Königswinter
Thermoschüttler (TS-100)	ProfiLab24, Berlin
Spannungsgeräte:	
Consort EV 232	Consort, Turnhout, Belgien
Enduro [™] 300V	LabNet International, Edison, USA
EPS 200, EPS 600, EPS 3500	Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterilbank (<i>E. coli</i>)	Galaire, Italien
Sterilbank (<i>D. discoideum</i>)	Nunc, Wiesbaden
UV-Tisch	Biostep, Jahnsdorf
UV-Crosslinker (Biolink DNA Crosslinker)	Biometra, Göttingen
Vakuum-Zentrifuge	Bachofer, Reutlingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad (Multitemp III)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Zentrifugen:	
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 1 S-R	Heraeus, Hanau
Rotina 380 R	Hettich, Tuttlingen
Sprout [®] Mini-Centrifuge	Heathrow Scientific, Northgate, UK
Universal 32	Hettich, Tuttlingen

7.2. Verbrauchsmaterialien

Bechergläser	Schott, Mainz
Cryoröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Costar-Platten	Sarstedt, Nürnberg
Einmalhandschuhe (Hansa Medical)	Kirchhoff Group, Hamburg
Einmalskalpell	Bayha, Tuttlingen
Einmalküvetten (1 mL)	Sarstedt, Nürnberg
Einwegspritzen (Omni-Fix 1 mL)	B. Braun, Melsungen
Einwegtücher	Kimberly-Clark, Forchheim
EP-Küvetten (VWR Collection 4 mm)	VWR, Darmstadt
Erlenmeyerkolben	Roth, Karlsruhe
Falconröhrchen (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nürnberg
Filterpapiere (3 mm Chr)	Whatman, Dassel
Glasflaschen	Schott, Mainz
Glaspipetten	Hirschmann, Eberstadt
Hybridisierungsröhren	Biometra, Göttingen
Nitrozellulose Filter (Typ HAWP 04700)	Millipore, Eschborn
Transfermembranen:	
porablot™ NCP (Protein)	Macherey-Nagel, Düren
Roti®-Nylon plus (RNA, DNA)	Roth, Karlsruhe
Amersham Hybond™-N+ (siRNAs)	VWR, Darmstadt
Amersham Hybond™-NX (siRNAs)	VWR, Darmstadt
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	Schütt, Göttingen
PCR-Reaktionsgefäße:	
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
0,2 mL LP Strips Tubes, 8-Strips	Biozym, Hess. Oldendorf
Optical Flat Cap Strips	Biozym, Hess. Oldendorf
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Reagenzgläser	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5 mL; 2 mL)	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss (1,5 mL)	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter	Sarstedt, Nürnberg

7.3. Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 40%)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Agar-Agar	AppliChem, Darmstadt
Aluminiumsulfat	Roth, Karlsruhe
APS	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Roth, Karlsruhe
BCIP-T	Fermentas, St. Leon-Rot
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz (Roti [®] -Quant)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Fluka, Deisenhofen
BSA	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
DMF	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma, Taufkirchen
DTT	Roth, Karlsruhe
EDC	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (99%)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (>99.8%)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
EvaGreen ^(R) Fluorescent DNA stain	Jena Bioscience, Jena
Ficoll 400	VWR, Darmstadt
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin (86 %)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
GTC	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe

Hexanuleotid Random-Primer-Mix	Roth, Karlsruhe
HL5 Medium	ForMedium, Norfolk, Großbritannien
Imidazol	Roth, Karlsruhe
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol (99%)	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Fluka, Deisenhofen
Methanol (99%)	Roth, Karlsruhe
Methylimidazol	Sigma, Taufkirchen
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Nonident [®] P40 (NP40)	Fluka, Deisenhofen
ONPG	Roth, Karlsruhe
Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure	Fluka, Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon	Roth, Karlsruhe
Ponceau S Lösung	Sigma, Taufkirchen
Roti [®] -Quant (Bradford Reagenz)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (37 %)	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Sephadex G-50 (Fine)	GE Healthcare, München
Spermidin	Roth, Karlsruhe

TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trinatriumcitrat	Merck, Darmstadt
Tris-Acetat	Roth-Karlsruhe
TritonX-100	Roth, Karlsruhe
TRIzol [®] -Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Tween [®] 20	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Fluka, Deisenhofen

7.4. Puffer und Lösungen

Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
BCIP-Lösung	50 mg/mL BCIP-T in DMF
Blockierlösung	5% w/v Magermilchpulver in 1x NCP
Church-Puffer	500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 1 mM EDTA 7% w/v SDS 1% w/v BSA
Coomassie-Lösung (kolloidal)	0,02% w/v Coomassie BrilliantBlue G-250 5% w/v Aluminiumsulfat 2% v/v ortho-Phosphorsäure 10% Ethanol
Coomassie-Entfärbelösung	10% Ethanol 2% v/v ortho-Phosphorsäure
Crosslinking-Lösung	127 mM Methylimidazol 160 mM EDC pH 8,0 mit HCl (15%) einstellen
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 500 mM NaOH
Denhardt-Lösung (100x)	2% w/v Ficoll 400 2% w/v Polyvinylpyrrolidon 2% w/v BSA

Denhardt-Puffer	120mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,7 5x Denhardt-Puffer 5x SSC 50% v/v Formamid 1% w/v SDS
Transkriptionspuffer (10x)	400 mM Tris/HCl, pH 8,0 200 mM MgCl ₂ 20 mM Spermidin 0,1% w/v TritonX-100
DNA-Auftragspuffer (6x)	20 mM Tris/HCl, pH 8,0 120 mM EDTA 50% w/v Glycerin 0,03% w/v Bromphenolblau 0,03% w/v Xylencyanol
Elektroporation (EP)-Puffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM Saccharose mit H ₃ PO ₄ pH 6,1 einstellen, sterilfilt.
Ethidiumbromid-Lösung	1 mg/mL Ethidiumbromid in dH ₂ O
Kernlysepuffer	50 mM HEPES pH 7,5 40 mM MgCl ₂ 20 mM KCl 5% w/v Saccharose 1 – 2% NP40
Lämmli-Puffer (2x)	125 mM Tris/HCl, pH 6,8 4% w/v SDS 20% v/v Glycerin 5% β-Mercaptoethanol 0,02% w/v Bromphenolblau
Lösung I	25 mM Tris/HCl, pH 7,4 10 mM EDTA 15% w/v Saccharose
Lösung II	200 mM NaOH 1% w/v SDS
Lösung III	3 M Natriumacetat pH 4,7

MOPS Puffer für PAA-Gele	20 mM MOPS, pH 7,0
NCP-Puffer (10x)	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 1,5 M NaCl 0,5% w/v Tween [®] 20
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl 500 mM Tris/HCl, pH 7,0
Novex [®] Tris-Glycin Transfer-Puffer (1x)	15 mM Tris 120 mM Glycin 10% v/v Methanol
NP40-Lösung (20%)	20% w/v Nonident [®] P40 in dH ₂ O
NuPAGE [®] MOPS SDS Laufpuffer (20x)	1 M MOPS 1 M Tris 69,3 mM SDS 20,5 mM EDTA
OLB Mix (5x)	200 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 M HEPES, pH 6,6 25 mM MgCl ₂ 250 µM dCTP, dGTP, dTTP 10 mM β-Mercaptoethanol 90 A ₂₆₀ u/mL Hexa-Random-Primer-Mix
ONPG-Lysepuffer	100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.0 1% w/v NP40
Proteingel-Laufpuffer (5x)	125 mM Tris 959 mM Glycin 5% w/v SDS
Protein-Sammelgelpuffer	500 mM Tris/HCl, pH 6,8 14 mM SDS
Protein-Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 14 mM SDS
RNA-Auftragspuffer	95% v/v Formamid 17 mM EDTA pH 8,0 0,025% w/v Bromphenolblau 0,025% w/v Xylencyanol (optional 1% Ethidiumbromid Lösung)

SDS Lysepuffer	0,7% w/v SDS in 1x TE-Puffer
<i>Semi-dry</i> Transfer-Puffer (1x)	50 mM Tris 40 mM Glycin 1,3 mM SDS 20% v/v Ethanol
Sephadex G-50 Lösung	5 g Sephadex G50 100 mL 1x TE Puffer
Soerensen-Phosphatpuffer (1x)	2 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄ mit H ₃ PO ₄ pH 6,0 einstellen
SSC (20x)	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat pH 7,0
<i>Stripping</i> -Lösung	0,1x SSC 1% w/v SDS
TBE-Puffer (5x)	445 mM Tris pH 8,2 445 mM Borsäure 10 mM EDTA
TE-Puffer (1x)	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 oder 8,0 1 mM EDTA
Wasch-Lösung A	2x SSC 0,1% w/v SDS
Wasch-Lösung B	0,1x SSC 0,1% w/v SDS
Wasch-Lösung I	2x SSC 0,1% w/v SDS
Wasch-Lösung II	1x SSC 0,1% w/v SDS
Wasch-Lösung III	0,5x SSC 0,1% w/v SDS
X-Gal Lösung	2% w/v X-Gal in DMF
Z-Puffer	100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 7 mL/L β-Mercaptoethanol

7.5. Antibiotika

Amphotericin (0,25 mg/mL)	PAA, Cölbe
Ampicillin (50 mg/mL)	Roth, Karlsruhe
Blasticidin (5 mg/mL)	Sigma, Taufkirchen
Geneticin G418 (100 mg/mL)	PAA, Cölbe
Penicillin (10000 u/mL)/Streptomycin (10 mg/mL)	PAA, Cölbe

7.6. Nährmedien

7.6.1. Medien für *Escherichia coli*

LB-Medium, pH 7,0	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 L dH ₂ O
LB-Amp-Medium	LB-Medium + 50 µg/mL Ampicillin
LB-Agar	LB-Medium + 13 g/L Agar-Agar
LB-Amp-Agar	LB-Agar + 50 µg/mL Ampicillin

7.6.2. Medien für *Dictyostelium discoideum*

BS10-Medium	G0-Medium + 10 µg/mL Blasticidin
BS10/G10-Medium	G0-Medium + 10 µg/mL Blasticidin + 10 µg/mL Geneticin (G418)
G0-Medium	HL5 Medium + 50 µg/mL Ampicillin + 0,25 µg/mL Amphotericin + 100 Einheiten/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin
G10-Medium	G0-Medium + 10 µg/mL Geneticin (G418)

HL5 Medium pH 6,7 (ForMedium)	14 g Pepton 7 g Hefeextrakt 13,5 g Glucose 0,5 g KH_2PO_4 0,5 g Na_2HPO_4 ad 1 L dH_2O
Phosphatagar	Soerensen-Phosphatpuffer 13 g/L Agar-Agar
SM-Agar pH 6,5	13 g Agar-Agar 10 g Pepton aus Casein 10 g Glucose 1 g Hefeextrakt 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,2 g KH_2PO_4 1,43 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ad 1 L dH_2O

7.7. Nukleotide

Desoxyribonukleotide: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Fermentas, St. Leon-Rot
Ribonukleotide: ATP, CTP, GTP, UTP	Fermentas, St. Leon-Rot
Radioaktiv markierte Nukleotide:	
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP (111 TBq/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (185 TBq/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP (110 TBq/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig

7.8. Antikörper

Maus-anti-Coronin (Hybridom Zelllinie: 176–3D6)	Universität Kassel, Kassel
Maus-anti-Discoidin (Hybridom Zelllinie: 80–52–13)	Universität Kassel, Kassel
Maus-anti-GFP (Hybridom Zelllinie: 264–449–2)	Universität Kassel, Kassel
Kanninchen-anti-CadA (DdCad-1)	Universität Toronto, Kanada
Kanninchen-anti- β -Galactosidase (ABIN99522)	antikörper-online.de, Aachen
AP-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen (115-055-003)	Dianova, Hamburg
AP-gekoppelter Ziege-anti-Maus (111-055-003)	Dianova, Hamburg

7.9. Kits

CloneJET™ PCR Cloning Kit (pJET1/blunt und pJET1.2/blunt)	Fermentas, St. Leon-Rot
DyNAmo™ cDNA Synthese Kit	Finnzymes, Vantaa, Finnland
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
NucleoSpin® ExtractII Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond® PC 100	Macherey-Nagel, Düren
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega, Mannheim
pKOSG-IBA-Dicty1	IBA, Göttingen
Stargate Transfer Reagent Set	IBA, Göttingen

7.10. Größenstandards

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (#SM0321)	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (#SM0311)	Fermentas, St. Leon-Rot
pUC 19 DNA/ <i>Msp</i> I Marker (#SM0221)	Fermentas, St. Leon-Rot
RiboRuler™ High Range RNA Ladder (#1821)	Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained Protein Molecular Weight Marker (#SM0441)	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (#SM1811)	Fermentas, St. Leon-Rot

7.11. Enzyme und Enzympuffer

DNaseI (RNase frei) (1 u/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 u/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
Klenow Fragment (10 u/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
konventionelle Restriktionsenzyme (10 u/μL) ^a	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> DNA Polymerase (rekombinant)	Universität Kassel, Kassel
<i>Pfu</i> DNA Polymerase (rekombinant) (2,5 u/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
ProteinaseK	Roth, Karlsruhe
RiboLock™ RNase Inhibitor (40 u/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
RNaseA (1 mg/mL)	Merck Biosciences, Bad Soden
S1 Nuklease (100 u/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA Polymerase (rekombinant)	Universität Kassel, Kassel

<i>Taq</i> DNA Polymerase (rekombinant) (1 u/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase (5 u/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Polymerase (5 u/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Polynukleotid Kinase (T4 PNK) (10 u/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
T7 RNA Polymerase (20 u/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
10x FastAP TM Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
10x <i>Pfu</i> Puffer (+MgSO ₄)	Fermentas, St. Leon-Rot
10x <i>Taq</i> Puffer (+KCl, +MgCl ₂)	Fermentas, St. Leon-Rot
10x T4 Ligase-Puffer (+DTT)	Fermentas, St. Leon-Rot
10x T4 PNK Reaktionspuffer A	Fermentas, St. Leon-Rot

^a Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden als „konventionelle Restriktionsenzyme“ von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen und in den mitgelieferten Enzympuffern nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

7.12. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Invitrogen (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen. Eine Liste mit den Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang aufgeführt (Tab. 13.8.).

7.13. Software

AIDA Imager Analyzer	Raytest, Straubenhardt
BioEdit Sequence Alignment Editor	Ibis Biosciences, Carlsbad
Fujifilm MultiGauge V3.2.	Fujifilm, Düsseldorf
Vector NTI Advance TM 10	Invitrogen, Karlsruhe
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego

7.14. Sequenzen

<u>Gen</u>	<u>Datenbankeintrag</u> ^a
<i>act6</i> (<i>D. discoideum</i>)	DDB_G0274135
<i>cadA</i> (<i>D. discoideum</i>)	DDB_G0285793
<i>cinD-1</i> (<i>D. discoideum</i>)	DDB_G0273061
DIRS-1 (<i>D. discoideum</i>)	GB_M11339.1; clone SB41

<i>drnB</i> (<i>D. discoideum</i>)	DDB_G0268410
<i>dscC-1</i> (<i>D. discoideum</i>)	DDB_G0273065
<i>ego-1</i> (<i>C. elegans</i>)	GB_AAT80367.1
<i>lacZ</i> (<i>E. coli</i>)	GB_AAC73447.1
<i>qde-1</i> (<i>N. crassa</i>)	GB_CAB42634.1
<i>rnu6</i> (U6) (<i>D. discoideum</i>)	DDB_G0295505
<i>rrpA</i> (<i>D. discoideum</i>)	DDB_G0289659
<i>rrpB</i> (<i>D. discoideum</i>)	DDB_G0291249
<i>rrpC</i> (<i>D. discoideum</i>)	DDB_G0280963
<i>sde-1</i> (<i>A. thaliana</i>)	GB_AAF74208.1
Skipper (<i>D. discoideum</i>)	GB_AF049230.1
<i>sno6</i> (DdR-6) (<i>D. discoideum</i>)	DDB_G0295531
<i>trxA</i> (TRX1) (<i>D. discoideum</i>)	DDB_G0294447

^a Nomenklatur nach <http://dictybase.org/> bzw. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

7.15. Plasmide

Die hier aufgeführten Plasmide entstammen anderen Arbeiten oder wurden von den angegebenen Herstellern bezogen. Sie konnten in unveränderter Form oder als Grundlage für eigene Plasmide eingesetzt werden. Teile dieser Plasmide und neu hergestellten Vektoren sind mit Klonierungsstrategie im Anhang dokumentiert (siehe Abschnitt 13.1.).

BS ^(r) Expressionskassette	(Sutoh, 1993)
pD BS ^(r)	(Pang et al., 1999)
pDEX RH NLS-cre	(Faix et al., 2004)
pDM304	(Veltman et al., 2009a)
pDM326	(Veltman et al., 2009a)
pDneo2 disc as	(Popova et al., 2006)
pDneo2 disc hp	(Martens et al., 2002)
pDneo2a	(Dubin and Nellen, 2010)
pDneo2a GFP	(Dubin and Nellen, 2010)
pET-14b β-gal	(Science Bridge e.V. Kassel)
pGEM [®] -T Easy	(Promega, Mannheim)
pJET1/blunt Cloning Vector	(Fermentas, St. Leon-Rot)

pJET1.2/blunt Cloning Vector	(Fermentas, St. Leon-Rot)
pKOSG IBA-Dicty1	(IBA, Göttingen)
pLPBLP	(Faix et al., 2004)
pLPBLP <i>rrpA</i> KO cre-lox BS ^(r)	(S. Kasten, unveröffentlicht)
pLPBLP <i>rrpB</i> KO cre-lox BS ^(r)	(S. Fuhrmann, unveröffentlicht)
pLPBLP <i>rrpC</i> KO cre-lox BS ^(r)	(S. Kasten, unveröffentlicht)
pTX GFP	(Levi et al., 2000)
<i>rrpA</i> KO BS ^(r)	(Martens et al., 2002)
<i>rrpB</i> KO BS ^(r)	(Martens et al., 2002)

7.16. Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> - DH5 α TM	(Invitrogen, Karlsruhe)
<i>Escherichia coli</i> – GIGA cells	(Stratagene, Amsterdam)
<i>Escherichia coli</i> – TOP 10	(IBA, Göttingen)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	(Williams and Newell, 1976)

7.17. *Dictyostelium*-Stämme

Die hier aufgeführten *Dictyostelium*-Stämme entstammen anderen Arbeiten und wurden nach Kontrolle in unveränderter Form oder als Grundlage für eigene Stämme verwendet (Details zur Nomenklatur siehe 8.3. bzw. 8.4.).

AX2 Wildtyp	(Watts and Ashworth, 1970)
<i>rrpA</i> — ^{H.M.}	(Martens et al., 2002)
<i>rrpA</i> — ^{lox}	(S. Kasten, unveröffentlicht)
<i>rrpA</i> — ^{rox}	(S. Kasten, unveröffentlicht)
<i>rrpB</i> — ^{rox}	(S. Fuhrmann, unveröffentlicht)
<i>rrpC</i> — ^{rox}	(S. Kasten, unveröffentlicht)
<i>rrpA</i> — ^{rox} <i>rrpB</i> — ^{lox}	(S. Fuhrmann, unveröffentlicht)
<i>rrpA</i> — ^{rox} <i>rrpB</i> — ^{rox}	(S. Fuhrmann, unveröffentlicht)
<i>rrpA</i> — ^{rox} <i>rrpB</i> — ^{rox} <i>rrpC</i> — ^{lox}	(S. Fuhrmann, unveröffentlicht)
<i>dmB</i> Δ — ^{rox}	(L. Avesson, unveröffentlicht)
<i>elp1</i> Δ — ^{lox}	(S. Gronemann, unveröffentlicht)

8. Methoden

Teile der Methoden wurden in überarbeiteter Form aus meiner Diplomarbeit „Klonierung und Charakterisierung von RNA abhängigen RNA-Polymerasen aus *Dictyostelium discoideum*“ übernommen.

8.1. Zellbiologische Methoden

8.1.1. Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde in LB-Medium bei 37°C auf einem Schüttler bei 185 rpm angezogen. Dem Medium wurden zur Selektion Antibiotika hinzugefügt. Frisch transformierte *E. coli* Zellen wurden auf LB-Amp-Platten kultiviert. Nachfolgend wurden diese dauerhaft bei 4°C gelagert.

8.1.2. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen mit der CaCl₂ Methode

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen von verschiedenen Stämmen wurde eine 2 mL Vorkultur in LB-Medium angeimpft und diese über Nacht bei 37°C als Schüttelkultur inkubiert. Mit 1 mL der Vorkultur wurden am nächsten Tag 100 mL LB-Medium inokuliert und als Schüttelkultur bei 37°C inkubiert. Diese Hauptkultur wurde auf eine optische Zelldichte von 0,3 bis 0,4 bei 600 nm (OD₆₀₀) angezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 3220 rcf für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 mL eiskaltem 50 mM CaCl₂ gelöst und die Suspension für 15 bis 30 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen erneut für 5 min bei 3220 rcf/4°C abzentrifugiert und das Zellpellet in 18 mL eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Hierzu wurde steriles 100%iges Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15% hinzugegeben und die Zellsuspension aliquotiert. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei –80°C.

8.1.3. Transformation von *E. coli*

Bei der klassisch chemischen Transformation wurde die Hitzeschock Methode eingesetzt. Hierzu wurden die bei –80°C gelagerten kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 200 µL davon zu einem Ligationsansatz hinzugegeben. Bei einer Retransformation wurde ca. 100 ng Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben. Die Ansätze wurden für 30 min auf Eis inkubiert und nachfolgend wurde der Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C auf einem Heizblock durchgeführt. Nach dem Hitzeschock wurde der Ansatz sofort auf Eis gebracht. Anschließend

wurde 1 mL LB-Medium hinzugegeben und die Probe für 30 min auf 37°C inkubiert. Nach dieser Regenerationsphase wurden die Zellen bei 1700 rcf für 5 min pelletiert, 1 mL des Überstands abgenommen und das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf LB-Amp Agarplatten ausplattiert. Da die verwendeten Plasmide für eine Ampicillin Resistenz kodieren, dient das Antibiotikum der Selektion der Transformanten. Die Anzucht dieser erfolgte für 12 bis 16 Stunden bei 37°C.

8.1.4. Blau-Weiß Selektion

Bei der Verwendung des pGEM[®]-T Easy Vektors besteht die Möglichkeit, eine Blau-Weiß Selektion durchzuführen. Dieser Vektor enthält im Bereich der MCS die kodierende Sequenz für das α Peptid des Enzyms β -Galactosidase unter der Kontrolle des lac Operators. Erfolgreiche Insertion eines Fragments unterbricht die kodierende Sequenz des β -Galactosidase Gens. Daher wird das Enzym nur in Klonen exprimiert, die kein Insert aufgenommen haben. Der lac-Operator und somit die Expression der β -Galactosidase wird durch IPTG induziert. β -Galactosidase spaltet das Substrat X-Gal, wobei das Spaltprodukt 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol entsteht, welches mit Luftsauerstoff zu einem blauen Farbstoff oxidiert. Bei der Blau-Weiß Selektion färben sich Klone ohne Insert blau, während Klone, die ein Insert enthalten, weiß bleiben. Hierzu wurden von den transformierten *E. coli* Zellen, auf den LB-Amp Agarplatten 50 μ L X-Gal Lösung (2%) und 15 μ L einer 1 M IPTG Lösung ausplattiert.

8.1.5. Anzucht von *K. aerogenes*

D. discoideum kann auf einem Bakterienrasen von *K. aerogenes* kultiviert werden. Hierfür wurde *K. aerogenes* über Nacht auf SM-Cobalt Agarplatten bei 30°C angezogen. Der entstandene Bakterienrasen wurde mit 5 mL Soerensen-Phosphatpuffer abgespült und eine KA-Suspension hergestellt. Je 200 μ L Zellsuspension konnten auf einer SM-Agarplatte ausplattiert werden und ebenfalls über Nacht bei 30°C angezogen werden. Auf diese KA-Platten wurden *D. discoideum* Zellen mit einem Zahnstocher angeimpft. Alternativ wurden *D. discoideum* Zellen zusammen mit der Bakteriensuspension auf SM-Agarplatten ausplattiert. KA-Platten konnten für ca. 3 Wochen bei 4°C gelagert werden.

8.1.6. Anzucht von *D. discoideum*

Die Kultur von *D. discoideum* erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 22°C bei Dauerlicht. In Schüttelkultur bei 150 rpm und in axenischem Medium beträgt die Verdoppelungszeit ca. 9 Stunden. Ab einer Zelldichte von ca. 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen/mL treten die Zellen in die stationäre Phase ein. Für einige Tage bleibt die Zelldichte konstant, bevor die Zellen aufgrund von Nahrungsmangel und Anreicherung von Stoffwechselprodukten absterben. Um gleichbleibende Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden für sämtliche Experimente nur exponentiell wachsende Kulturen mit einer Zelldichten zwischen 1×10^6 bis 3×10^6 Zellen/mL verwendet. Hierzu wurden alle für die jeweiligen Versuche benötigten Kulturen ein Tag zuvor auf eine Zelldichte von ca. 5×10^5 Zellen/mL gebracht. Je nach Anforderung und zum Schutz vor Kontaminationen enthielt das Nährmedium verschiedene Antibiotika. Bei Kulturen in Petrischalen oder Costar-Platten fand alle 3 Tage ein kompletter Mediumwechsel statt. Bei Schüttelkulturen wurde im selben Abstand mit frischem Medium verdünnt.

8.1.7. Herstellung von Sporen von *D. discoideum*

Zur dauerhaften Lagerung von *D. discoideum* Zelllinien wurden Sporen von diesen erzeugt. Hierzu wurden 2×10^8 Zellen einer dicht bewachsenen Schüttelkultur bei 500 rcf/4°C für 3 min geerntet und diese in 30 mL Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen, um sämtliches Medium zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation bei 500 rcf/4°C für 3 min konnte das Pellet in 0,5 mL Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert werden. Nachfolgend wurde diese Suspension auf einer Phosphatagarplatte gleichmäßig verteilt und die Platte für einige Minuten unter der Sterilbank getrocknet. Die Entwicklung der Sporen erfolgte bei 22°C im Dauerlicht. Nach 3 – 4 Tagen wurden die reifen Sporenköpfe durch Abklopfen in den Deckel der Petrischale geerntet. Nach Resuspension der Sporen in 1 – 2 mL Soerensen-Phosphatpuffer wurden diese in Cyroröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Mit 150 µL Sporensuspension wurden vor den Experimenten frische Kulturen für die benötigten Zelllinien gestartet. Hierfür wurden in einer Petrischale die Sporen bis zum Schlupf der Amöben zunächst in GO-Medium und nachfolgend im entsprechenden Selektionsmedium kultiviert.

8.1.8. Transformation von *D. discoideum* durch Elektroporation

Bei der Transformation von *D. discoideum* durch Elektroporation wurden 2×10^7 Zellen von einer exponentiell wachsenden Kultur entnommen und diese für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 500 rcf/4°C für 3 min pelletiert. Hiernach erfolgten Waschschrte einmal in 10 mL Soerensen-Phosphatpuffer und zweimal in 10 mL EP-Puffer. Die Zentrifugation zwischen den Waschschrten wurde ebenfalls bei 500 rcf/4°C für 3 min durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Zellen in 700 µL EP-Puffer resuspendiert, 10 µg der zu transformierenden DNA (linearisiertes oder super coiled Plasmid) hinzugegeben und der Ansatz mit EP-Puffer auf 800 µL aufgefüllt. Die Suspension wurde in eine vorgekühlte EP-Küvette überführt und der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Hiernach fand die Elektroporation bei 1 kV (= 2,5 kV/cm), 25 µF und 200 Ω statt. Die Küvette wurde noch einmal für 10 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden jeweils 8 µL 100 mM MgCl₂ und 100 mM CaCl₂ in eine Petrischale pipettiert. Nach Zugabe der transformierten Zellen wurden diese 15 -30 min in der Petrischale belassen und dann mit 10 mL GO-Medium überschichtet. Am nächsten Tag wurde das GO-Medium durch entsprechendes Selektionsmedium ersetzt. Bei erfolgreicher Transformation wurden nach etwa einer Woche einzelne Klone sichtbar.

8.1.9. Subklonierung von *D. discoideum*

Um nach erfolgreicher Transformation Einzelklone zu erhalten, wurde eine Subklonierung durchgeführt. Hierzu wurde das Nährmedium abgenommen, jedoch ohne die Klone abzuspielen. Nachfolgend wurden die Zellen mit 2 mL Nährmedium von der Petrischale gelöst. Durch Abspülen einer KA-Platte mit 3 – 5 mL Soerensen-Phosphatpuffer konnte zuvor eine dichte KA-Suspension hergestellt werden. Zu 900 µL KA-Suspension wurden 100 µL der transformierten *D. discoideum* Zellen hinzugeben und miteinander vermischt. Von dieser Lösung wurden zwei weitere Verdünnungsstufen hergestellt, indem 100 µL der Verdünnung mit 900 µL KA-Suspension gemischt wurden. Nachfolgend wurden je nach Anzahl der Klone 100 - 200 µL von jeder Verdünnungsstufe auf SM-Agarplatten ausplattiert und bei 22°C im Dauerlicht inkubiert. Nach 3 – 4 Tage erzeugte *D. discoideum* einzelne Fresshöfe (Plaques) im Bakterienrasen. Von diesen Plaques wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas vegetative Zellmasse abgenommen und in eine Costar-Platte mit GO-Medium überführt. Nach 2 Tagen wurde das GO-Medium durch entsprechendes Selektionsmedium ersetzt.

8.1.10. Erstellung eines RNA Expressionsprofils während der Entwicklung von *D. discoideum* (developmental time course)

Für die Erstellung eines RNA Expressionsprofils während des Entwicklungszyklus von *D. discoideum* (developmental time course) werden 5×10^7 Zellen auf Nitrozellulose Filter gegeben. Nachfolgend wird zu verschiedenen Zeitpunkten die Gesamt-RNA in einem Zeitraum von 24 Stunden aus den Zellen jeweils eines Filters aufgereinigt.

Hierzu wurden von einer exponentiell wachsenden Kultur 5×10^8 Zellen abgenommen und für 5 min bei 500 rcf/4°C in 50 mL Falconröhrchen pelletiert. Nachfolgend konnten die Zellen in 20 mL Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert und vereinigt werden. Nach dem Waschschrift wurde das Pellet in Phosphatpuffer erneut resuspendiert, so dass man eine Zellsuspension mit einer Dichte von 1×10^8 Zellen/mL erhielt. Von dieser Suspension wurden vorsichtig 500 µL auf Nitrozellulose Filter (Typ HAWP 04700) gegeben. Die Filter wurden zuvor in destilliertem Wasser für 3-5 min gekocht und in eine Plastik-Kiste auf drei Lagen 3 mm Whatman Papier, welches in Soerensen-Phosphatpuffer getränkt wurde, ausgelegt. Nach dem Animpfen wurden Proben zu den Entwicklungszeitpunkten 0, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 21 bzw. 24 Stunden entnommen. Hierzu wurde je ein Filter in ein 50 mL Falconröhrchen überführt. Nach Zugabe von 20 mL Phosphatpuffer wurden die Zellen durch Vortexen vom Filter gespült und bei 880 rcf/4°C für 10 min pelletiert. Aus den Zellen erfolgte anschließend die Extraktion der Gesamt-RNA.

8.2. Präparation von Nukleinsäuren

8.2.1. Plasmidminipräparation

Um geringe Mengen von Plasmid-DNA aus *E. coli* aufzureinigen, wurde eine Plasmidminipräparation mit alkalischer Lyse durchgeführt (Birnboim and Doly, 1979). Hierzu wurden in die Deckel von 1,5 mL Reaktionsgefäßen mit einer heißen Nadel Löcher gestochen und diese mit 1,5 mL LB-Amp Medium befüllt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden diese 1,5 mL Kulturen mit Klonen von einer Transformation angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler bei 185 rpm inkubiert.

Die 1,5 mL Bakterienkultur wurde am nächsten Tag für 5 min bei 1700 rcf pelletiert und der Überstand dekantiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µL Lösung I resuspendiert und nachfolgend 200 µL Lösung II hinzugegeben. Nach einem fünfminütigen Inkubationsschritt auf Raumtemperatur wurden 150 µL vorgekühlte Lösung III hinzugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 20800 rcf/4°C die Zellreste pelletiert. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mL 100%igen Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde 30 min bei 20800 rcf/4°C abzentrifugiert und in 70%igen Ethanol gewaschen. Die getrocknete Plasmid-DNA wurde in 15 µL dH₂O aufgenommen.

Sollte eine Sequenzierung der Plasmid-DNA durchgeführt werden, wurde die Plasmidminipräparation mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

8.2.2. Plasmidmaxipräparation

Um größere Mengen Plasmid-DNA z.B. für präparative Restriktionsspaltungen zu gewinnen, wurde eine Plasmidmaxipräparation durchgeführt. Hierfür wurden in einen sterilen Erlenmeyerkolben 100 mL LB-Amp-Medium gegeben und mit *E. coli* Zellen angeimpft. Die Kultur wurde auf einem Schüttler bei 185 rpm über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Bakterienkultur wurde am nächsten Tag in 50 mL Falconröhrchen überführt und die Zellen bei 1700 rcf/4°C für 10 min pelletiert. Die Zellpellets wurden in 4 mL Lösung I resuspendiert und vereinigt. Im Anschluss wurden 8 mL Lösung II hinzugegeben und durch Invertieren des Röhrchens die Proben gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 6 mL vorgekühlte Lösung III hinzugegeben und durch Invertieren des Röhrchens erneut gemischt. Es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 5 min auf Eis.

Durch Zentrifugation für 30 min bei 18500 rcf/4°C wurden die Zellreste pelletiert und nachfolgend durch Filtration der Überstand ohne Verunreinigungen in ein frisches 50 mL Falconröhrchen überführt. Zu dem Überstand wurden 0,6 Volumenanteile 100%iges Isopropanol gegeben und die Proben gut gemischt. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 18500 rcf/4°C. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 250 µL dH₂O resuspendiert und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurde dasselbe Volumen einer 8 M LiCl-Lösung gegeben, gemischt und für 30 min auf –20°C inkubiert. Durch diesen zusätzlichen Reinigungsschritt werden die meisten Proteine von der Plamid-DNA getrennt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 20800 rcf/4°C wurden die bakteriellen Proteine pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches 2 mL Reaktionsgefäß überführt und dasselbe Volumen 100%igen Ethanol hinzugegeben. Die Lösung wurde anschließend noch einer Fällung und einem Waschschrift unterzogen und die getrocknete Plasmid-DNA in 100 µL dH₂O resuspendiert.

Sollte die Plasmidpräparation zur Transformation in *D. discoideum* oder für eine *in vitro* Transkription eingesetzt werden, wurde die Präparation der Plasmid-DNA mit dem NucleoBond® PC 100 Kit entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Durch die Aufreinigung mittels Kit sollte eine höhere Reinheit und somit eine bessere Effizienz bei Transformation oder Transkription erreicht werden.

8.2.3. Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

Für die Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum* (Hughes and Welker, 1988), z.B. für Southern Blot Analysen, wurden 2×10^8 Zellen einer axenisch gewachsenen Kultur hoher Dichte (ca. 5×10^6 Zellen/mL) verwendet. Die Zellen wurden 5 min bei 500 rcf/4°C pelletiert und in 20 mL eiskaltem Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 500 rcf/4°C wurde das Zellpellet in 45 mL eiskaltem Kernlysepuffer suspendiert. Durch Zugabe einer 20%igen NP40-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 – 2% erfolgte die Lyse der Zellen. Die noch intakten Zellkerne wurden bei 18500 rcf/4°C für 15-30 min abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Durch Zugabe von 5 mL SDS Lysepuffer wurden die Zellkerne lysiert und nach Zugabe von 100 µL Proteinase K (25 mg/mL) wurde die Lösung für 1 – 3 h auf 60°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform wurde das Lysat für ca. 10 min auf eine Schwenkplatte verbracht und anschließend 30 min bei 18500 rcf/4°C zentrifugiert. Die DNA in der wässrigen Phase wurde in ein frisches 15 mL Falconröhrchen überführt und gefällt. Die Resuspension der DNA erfolgte in 100 µL dH₂O.

8.2.4. Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum* im kleinen Maßstab

Die Präparation von chromosomaler DNA aus *D. discoideum* im kleinen Maßstab wurde eingesetzt, um in Costar-Platten kultivierte Transformanden mittels PCR analysieren zu können.

Hierzu wurde das Nährmedium vorsichtig, ohne die Zellen abzuspülen, aus der dicht bewachsenen Costar-Platte entfernt. Nachfolgend wurden die Zellen mit jeweils 1 mL Soerensen-Phosphatpuffer abgespült und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 850 rcf wurden die Zellen pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µL SDS Lysepuffer resuspendiert und mit 10 µL Proteinase K (25mg/mL) versetzt und anschließend für 1 – 3 h auf 60°C inkubiert. Danach wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt und die genomische DNA gefällt. Diese wurde in 15 µL dH₂O aufgenommen.

8.2.5. Präparation von Gesamt-RNA aus *D. discoideum*

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus *D. discoideum* wurde die TRIzol[®]-Methode (Chomczynski, 1993; Chomczynski and Sacchi, 1987) verwendet.

Die Erstellung eines RNA Expressionsprofils während der Entwicklung (vgl. 7.1.10.) oder die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus einer exponentiell wachsenden Schüttelkultur erfolgte aus 5×10^7 Zellen. Diese wurden bei 500 rcf/4°C für 5 min pelletiert und nachfolgend in 20 mL vorgekühlten Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 500 rcf/4°C wurden die Zellen mit 1 mL TRIzol[®]-Reagenz lysiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 200 µL Chloroform versetzt, durch Vortexen gemischt und erneut für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 16000 rcf/4°C. Nachfolgend wurden ca. 600 µL des wässrigen Überstands in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µL Isopropanol (100%) versetzt. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur konnte das Präzipitat durch Zentrifugation bei 16000 rcf/4°C für 15 min pelletiert werden. Abschließend wurde die gefällte Gesamt-RNA zweimal in 1 mL 70%igen Ethanol gewaschen und das getrocknete Pellet in 150 µL dH₂O resuspendiert.

Eine photometrische Quantifizierung der aufgereinigten Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des NanoDrop Spectrophotometers. Zur qualitativen Analyse wurden 5µg Gesamt-RNA auf ein denaturierendes GTC Agarosegel aufgetragen.

8.3. Molekularbiologische Methoden

8.3.1. Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese

8.3.1.1. Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Standardmäßig wurde doppelsträngige DNA in 0,8% - 2,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Hierbei wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld zum positiven Pol. Die Auftrennung in der Gelmatrix erfolgt in Abhängigkeit von der Größe der Fragmente und von den vorhandenen Sekundärstrukturen.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TBE Puffer suspendiert und aufgekocht. Zu der aufgekochten Agaroselösung und nach kurzem Abkühlen wurden 10 µL/100 mL Ethidiumbromid-Lösung (10mg/mL) gegeben, welches mit den Basen der Nukleinsäuren interagiert und unter UV-Licht von 560 nm fluoresziert. Die flüssige Agaroselösung wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen und nach dem Erstarren des Gels mit 1x TBE-Puffer befüllt. Die DNA Proben wurden vor dem Auftrag mit 1/6 Volumen 6x DNA-Auftragspuffer versetzt und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von max. 10 V pro cm Laufstrecke. Die angefärbten Banden konnten mit UV-Licht sichtbar gemacht werden und photographisch mit einer CCD-Kamera dokumentiert werden.

8.3.1.2. Auftrennung von RNA durch Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von Gesamt-RNA erfolgte in 1,2%igen denaturierenden Guanidiniumthiocyanat-(GTC)-Agarosegelen. Diese wurden wie DNA-Agarosegele hergestellt, jedoch wurde nachdem die aufgekochte Agarose auf 60°C abgekühlt war, eine 1 M GTC-Lösung im Verhältnis 1 : 50 hinzugegeben und das Gel sofort gegossen. Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde kurz vor dem Gellauf mit dem selben Volumen RNA-Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis inkubiert. Um eine Überhitzung des Gels zu verhindern, was die Zersetzung von GTC zu Blausäure zur Folge hätte, erfolgte der Gellauf im Kühlraum. Die Dokumentation erfolgte auch hier mit dem INTAS-Geldokumentationssystem unter UV-Licht bei 256 nm.

8.3.1.3. Auftrennung von Nukleinsäuren durch Polyacrylamidgelelektrophorese

Polyacrylamidgele (PAA-Gele) wurden zur Untersuchung von *in vitro* Transkripten, kurzen DNA-Fragmenten und zum Nachweis kleiner RNAs in Gesamt-RNA eingesetzt, da mit ihnen

im Vergleich zu Agarosegelen eine engmaschigere Gelmatrix erzeugt werden kann. Hierdurch wird ein höheres Auflösungsvermögen im niedermolekularen Bereich erzeugt. Durch Zugabe hoher Konzentrationen von Harnstoff werden in der Gelmatrix denaturierende Bedingungen geschaffen.

Je nach Verwendungszweck wurden TBE- oder MOPS-gepufferte PAA-Gele eingesetzt. Hierzu wurden die in Tabelle 8.1. exemplarisch aufgeführten Komponenten zusammen gemischt und entgast. Zum Starten der Polymerisierungsreaktion wurden 600 µL APS (10%), welches als Radikalstarter fungierte und 60 µL TEMED, welches als Katalysator diente, hinzugeben. Nachfolgend wurde die noch flüssige Lösung zügig zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach erfolgter Polymerisierung des Gels wurde dieses für den Gellauf in eine entsprechende Apparatur eingespannt und diese mit dem jeweiligen Laufpuffer befüllt. Die Proben wurden kurz vor dem Auftrag mit demselben Volumen RNA-Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte unter den in Tabelle 8.1. angegebenen Bedingungen.

Tab. 8.1.: Exemplarische Zusammensetzung der verwendeten denaturierenden PAA-Gele.

10% TBE PAA-Gel		11% MOPS PAA-Gel	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
Harnstoff (7 M)	25,2 g	Harnstoff (7 M)	25,2 g
Acrylamid-Lösung (40%)	15 mL	Acrylamid-Lösung (40%)	16,5 mL
5x TBE Puffer	12 mL	1 M MOPS (pH 7,0)	1,2 mL
dH ₂ O	ad 60 mL	dH ₂ O	ad 60 mL
Laufpuffer: 1x TBE Puffer		Laufpuffer: 20 mM MOPS Puffer (pH 7,0)	
Elektrophorese limitierender Parameter: 20 W		Elektrophorese limitierender Parameter: 150 V	

8.3.2. Reinigung von Nukleinsäuren

8.3.2.1. Phenol / Chloroform Extraktion

Durch eine Phenol/Chloroform Extraktion können in wässrigen Lösungen Proteine von Nukleinsäuren getrennt werden. Hierbei wurde die nukleinsäurehaltige Lösung mit demselben Volumen Phenol/Chloroform versetzt und ca. 1 min gevortext. Danach wurde die Probe 30 min bei 20800 rcf zentrifugiert und die obere wässrige Phase, welche die Nukleinsäuren enthält, abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Um mögliche Reste des organischen Lösungsmittels zu entfernen, wurden die Nukleinsäuren anschließend einer Ethanol Fällung unterzogen.

8.3.2.2. Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen wurde zu der zu fällenden Probe 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat Lösung (pH 4,7) und 3 Volumen Ethanol (100%) hinzugegeben. Alternativ wurde 0,8 Volumen Isopropanol (100%) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für mindestens 30 min auf -20°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben 30 min bei 20800 rcf/ 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gefällten Nukleinsäuren wurden mit 500 μL 70% Ethanol versetzt und erneut bei 20800 rcf für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet und in der gewünschten Menge dH_2O resuspendiert.

8.3.2.3. Gelelution

Nach elektrophoretischer Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen können diese wieder aus der Agarose aufgereinigt werden. Hierzu wurde die entsprechende Bande auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nachfolgend wurde das DNA-Fragment mit dem NucleoSpin[®] ExtractII Kit oder GeneJET[™] Gel Extraction Kit nach Angaben der Hersteller aufgereinigt.

8.3.2.4. Gelfiltration

Die Aufreinigung mittels Gelfiltration wurde für die Abtrennung von nicht inkorporierten Nukleotiden nach der Herstellung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren (vgl. 7.3.13) eingesetzt. Grundprinzip bei diesem Trennverfahren ist, dass kleinere Moleküle in die Poren der Gelfiltrationssäule eindringen können und somit eine längere Verweildauer in dieser haben. Größere Moleküle können nicht in die Säulenmatrix eindringen und werden somit schneller eluiert. Für die Gelfiltration wurden Sephadex G-50 fine Säulen hergestellt. Hierzu wurde das untere Ende einer 1 mL Einwegspritze mit Glaswolle verstopft und diese mit Sephadex G-50 fine Lösung befüllt. Zum Verdichten der Säulenmatrix wurden die Säulen in einem 15 mL Falconröhrchen für 2 min bei 1000 rcf zentrifugiert. Die im 15 mL Falconröhrchen befindliche Säule wurde zusätzlich in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gestellt, um den Säulendurchfluss sammeln zu können. Die aufzureinigenden Proben wurden mit dH_2O auf 100 μL aufgefüllt und auf die Säule gegeben. Die Gelfiltration wurde durch Zentrifugation für 2 min bei 1000 rcf beschleunigt.

8.3.3. Endonukleolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

DNA durch Restriktionsendonukleasen an definierten Stellen gespalten werden und diese stellen somit eines der Hauptwerkzeuge der Molekularbiologie dar. Typ II Restriktionsendonukleasen schneiden innerhalb ihrer jeweils spezifischen Erkennungssequenz, wobei in den beiden DNA-Strängen die Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxygruppe gespalten wird. Hierbei können Spaltprodukte mit glatten Enden oder einander komplementären 5'- bzw. 3'-überhängenden Enden entstehen. Die spezifischen Spaltprodukte, welche beim Schneiden von Plasmiden oder DNA-Fragmenten entstehen, können gelelektrophoretisch aufgetrennt werden, was eine Größenabschätzung und Isolierung einzelner Fragmente erlaubt.

Die Spaltung wurde in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern, welche auf die spezifischen Eigenschaften der Enzyme abgestimmt sind, durchgeführt. Bei der Auswahl der Puffer und der Kombination der Enzyme wurde darauf geachtet, dass die Aktivität im jeweiligen Enzympuffer mindestens 50% betrug. Typische Restriktionsansätze sind in Tabelle 8.2. aufgeführt. Analytische Restriktionsspaltungen wurden für die Charakterisierung von Plasmiden und deren Inserts verwendet. Präparative Restriktionsspaltungen wurden durchgeführt, wenn Spaltprodukte für Ligationen und andere Reaktionen verwendet werden sollten. Hierzu wurde Plasmid-DNA von Maxipreparationen eingesetzt. Die Restriktionsspaltungen erfolgten für 2 h – 16 h bei 37°C bzw. dem enzymespezifischem Temperaturoptimum. Da nachfolgend eine Gelelektrophorese durchgeführt wurde, erfolgte keine Inaktivierung der Enzyme. Sollten DNA-Fragmente nachfolgend in Ligationen eingesetzt werden, wurde diese zunächst aufgereinigt.

Tab. 8.2.: Typische Ansätze für analytische und präparative Restriktionsspaltung.

Komponente	Ausgangs- konzentration	analytische Restriktionsspaltung	präparative Restriktionsspaltung	
			Vektor	Insert
Plasmid-DNA	-----	5 µL	5 µL ^a [1 µg/µL]	10 µL ^a [1 µg/µL]
Enzym I	10 u/µL	0,5 µL	2 µL	2 µL
Enzym II	10 u/µL	0,5 µL ^a	2 µL ^a	2 µL ^a
Enzympuffer	10x	3 µL ^a	10 µL ^a	10 µL ^a
RNaseA	1 mg/mL	1 µL	2 µL	2 µL
Fast AP	1 u/µL	---	2 µL	---
dH ₂ O	---	5 µL	28 µL	24 µL
Gesamtvolumen	---	15 µL	50 µL	50 µL

^a Werte wurden entsprechend den eingesetzten Mengen angepasst.

8.3.4. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente können durch das Enzym T4 DNA Ligase kovalent miteinander verbunden werden, wobei Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Enden

zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente gebildet werden. Durch diese Reaktion können glatte DNA-Enden aber auch kompatible einzelsträngige Überhänge, welche durch Restriktionsendonukleasen erzeugt wurden, miteinander verbunden werden. Durch Dephosphorylierung der DNA-Enden kann diese Reaktion unterbunden werden.

Da die Effizienz von Ligationen durch das molare Verhältnis zwischen Insert und Vektor bestimmt wird, wurde für die Berechnung die Gleichung 8.1. verwendet.

$$[8.1.] \quad \frac{\text{Menge Vektor [ng]} \times \text{Größe Insert [kB]}}{\text{Größe Vektor [kB]}} \times \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Menge Insert [ng]}$$

Gl. 8.1.: Berechnung des molaren Verhältnis zwischen Vektor und Insert. Typischerweise wurden 20 – 100 ng Vektor, bei einem molaren Verhältnis Insert : Vektor von 1:3 / 1:5 verwendet.

In Tabelle 8.3. ist ein typischer Ligationsansatz exemplarisch aufgeführt. Eine Religation linearisierter Vektoren wurde durch deren Behandlung mit thermosensitiver alkalischer Phosphatase (FastAPTM) verhindert. Die Ligation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C. Nachfolgend wurde der gesamte Ligationsansatz in kompetente *E. coli* Zellen transformiert (vgl. Abschnitt 8.1.3.).

Tab. 8.3.: Exemplarische Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Vektor	100 ng/μL	0,5 μL ^a
Insert	25 ng/μL	0,5 μL ^a
T4 DNA Ligasepuffer	10x	1,5 μL
T4 DNA Ligase	5 u/μL	1 μL
dH ₂ O	----	11 μL
Gesamtvolumen	----	25 μL

^a Werte wurden den Erfordernissen entsprechend angepasst.

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden CloneJETTM PCR Cloning Kit (pJET1/blunt und pJET1.2/blunt Vektor) und pGEM[®]-T Easy Vector System I nach Angaben der Hersteller eingesetzt.

8.3.5. Modifikation von DNA-Enden für Ligationen

Wurden durch Restriktionsspaltungen nichtkompatible DNA-Enden erzeugt, welche jedoch miteinander verbunden werden sollten, mussten zunächst glatte DNA-Enden erzeugt werden. 5'-Überhänge konnten durch das Enzym T4 DNA Polymerase aufgefüllt oder durch S1 Nuklease entfernt werden. 3'-Überhänge wurden durch T4 DNA Polymerase oder S1 Nuklease Behandlung entfernt. Die Reaktionen hierfür wurden entsprechend der Angaben des Herstellers der Enzyme durchgeführt. Nachfolgend wurden die modifizierten DNA-Fragmente mit dem NucleoSpin[®] ExtractII Kit aufgereinigt und konnten nach photometrischer Quantifizierung in Ligationen eingesetzt werden.

8.3.6. Polymerase Kettenreaktion

Durch Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können DNA-Fragmente ausgehend von einer bekannten Sequenz exponentiell amplifiziert werden (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985). Primer, kurze einzelsträngige DNA-Moleküle, binden bei dieser Reaktion spezifisch an komplementäre Bereiche in der eingesetzten *Template*-DNA. Durch Verwendung von thermostabilen DNA Polymerasen wird im Verlauf der PCR Zyklen, die zwischen den Primern gelegene Sequenz exponentiell vervielfältigt. Bei Verwendung von DNA Polymerasen mit *proofreading* Aktivität wird die generierte Sequenz auch Korrektur gelesen.

Die PCR-Reaktionen wurden nach den in Tabelle 8.4. aufgeführten Reaktionsansätzen durchgeführt, wobei jedoch die Menge des DNA *Templates* und die eingesetzten Polymerasen variieren konnten. Sollten PCR-Produkte kloniert werden wurde PCR-Ansatz I gewählt. Zur Analyse von in Costar-Platten kultivierten Transformanten von *D. discoideum* wurde nach der Präparation von chromosomaler DNA (vgl. Abschnitt 8.2.4.) PCR-Ansatz II verwendet.

Tab. 8.4.: Exemplarische PCR-Reaktionsansätze.

Komponente	Ausgangskonzentration	PCR-Ansatz I	PCR-Ansatz II
<i>Template</i> DNA	10 - 100 ng/μL	1 μL ^a	5 μL ^a
PCR Puffer (+MgCl ₂ , KCl)	10x	5 μL	2,5 μL
dNTPs	2 mM	5 μL	2,5 μL
5'-Primer	5 μM	5 μL	2,5 μL
3'-Primer	5 μM	5 μL	2,5 μL
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	---	1 μL	---
<i>Taq</i> DNA Polymerase	---	2 μL	1 μL
dH ₂ O	-----	26 μL	9 μL
Gesamtvolumen	-----	50 μL	25 μL

^a Werte wurden den Erfordernissen entsprechend angepasst.

Bei den verwendeten PCR-Programmen wurden *Annealing*-Temperatur und -Zeit, *Elongations*-Temperatur und Zeit sowie die Zyklenzahl in Abhängigkeit der verwendeten *Template* DNA, des Schmelzpunkts der Primer, der eingesetzten Polymerase und dem zu erwarteten PCR-Produkt variiert. Daher ist das in Tabelle 8.5. angegebene PCR-Programm als Grundeinstellung zu verstehen.

Tab. 8.5.: Programmbeispiel einer Standard-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
1	94°C	5 min	1
2	94°C	15 sec	30 ^a
3	50°C ^a	15 sec ^a	(von Schritt 2 – 4)
4	60°C ^a	1 min / kB ^a	
5	60°C ^a	5 min	1

^a Werte wurden den Erfordernissen entsprechend angepasst.

8.3.7. Reverse Transkription

Eine reverse Transkription (RT) wird durchgeführt, um RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Bei dieser Methode kann ein Oligo(dT)_n Primer eingesetzt werden, welcher an den Poly(A)-Schwanz von mRNAs bindet, jedoch können auch sequenzspezifische Primer oder Hexa-Random-Primer verwendet werden. Durch Einsatz einer reversen Transkriptase, einer RNA abhängigen DNA-Polymerase, wird dann das eingesetzte RNA *Template* zur cDNA umgeschrieben. Die entstandene cDNA kann nachfolgend in eine PCR eingesetzt werden.

Vor der reversen Transkription wurde eine DNase Behandlung der aufgereinigten Gesamt-RNA durchgeführt, um so DNA Kontaminationen in der RNA zu entfernen. Der Reaktionsansatz für eine DNase Behandlung ist in Tabelle 8.6. aufgeführt. Die Behandlung erfolgte bei 37°C für 1 h. Nachfolgend wurde die RNA einer Phenol/Chloroform Extraktion und einer Fällung unterzogen. Die getrocknete RNA wurde in 10 µL dH₂O resuspendiert.

Tab. 8.6.: Reaktionsansatz für DNase Behandlung aufgereinigter Gesamt-RNA,

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
aufgereinigte Gesamt RNA	~ 2 µg/µL	5 µL
DNase Puffer (+MgCl ₂)	10x	5 µL
DNase (RNase frei)	1 u/µL	2 µL
RiboLock™ RNase Inhibitor	40 u/µL	2 µL
dH ₂ O	-----	36 µL
Gesamtvolumen	-----	50 µL

Nachfolgend wurde die cDNA-Synthese mit Hilfe des DyDAmo™ cDNA synthesis Kit nach Angaben des Herstellers wie in Tabelle 8.7. beschrieben, durchgeführt. Zur Denaturierung der DNase behandelten Gesamt-RNA wurde diese zunächst für 5 min auf 95°C inkubiert und nachfolgend sofort auf Eis gebracht. Die reverse Transkription und das Stoppen der Reaktion wurden in einem Thermocycler unter den in Tabelle 8.8. angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Tab. 8.7.: Reaktionsansatz für reverse Transkription mit DyNAmo cDNA synthesis Kit (Finnzymes).

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Gesamt-RNA	~ 1 µg/µL	1 µL
Oligo(dT) _n Primer	100 ng/µL	1 µL
reverse Transkriptase Puffer	2x	10 µL
M-MuLV RNase H ⁺ reverse Transkriptase	---	2 µL
dH ₂ O	---	6 µL
Gesamtvolumen		20 µL

Tab. 8.8.: Reaktionsbedingungen für die cDNA Synthese.

Schritt	Temperatur	Zeit
Primer Extension	25°C	10 min
cDNA Synthese	37°C	60 min
Stoppen der Reaktion	85°C*	5 min
Kühlen der Probe	4°C*	∞

Von der synthetisierten cDNA wurde 1 – 2 µL in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Um eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA ausschließen zu können, wurde eine PCR-Reaktion mit den spezifischen Primern zum Nachweis von Thioredoxin durchgeführt. Da dieses Gen ein Intron enthält, entstehen unterschiedlich große PCR-Produkte von genomischer DNA (740 bp) und cDNA (338 bp).

8.3.8. Quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative *real-time* PCR (qPCR) ist eine vergleichsweise einfache aber sehr sensitive Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren, weswegen sie für eine enorme Anzahl unterschiedlicher Anwendungen eingesetzt wird (Higuchi et al., 1993; Pfaffl, 2010). In Verbindung mit einer reversen Transkriptase Reaktion (qRT-PCR) können hierbei auch Transkripte in sehr geringer Kopienzahl quantifiziert werden. Hauptsächlich werden zur Quantifizierung der Amplifikate einer PCR interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. SYBR-Green® oder Taqman Sonden eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung des entstehenden Fluoreszenzsignals am Ende bzw. während jedes Zyklus der PCR.

Bei Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green® (asymmetrischer Cyanin-Farbstoff) bindet dieser an die kleine Furche entstehender doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs ansteigt. Dieser Anstieg wird gemessen und ist proportional zur Amplifikatmenge, was Rückschlüsse auf die Ausgangskopienzahl in der eingesetzten *Template* DNA zulässt. Zur Analyse der entstandenen Amplifikate kann nach der PCR eine Schmelzkurve erstellt werden. Während dieser wird die Temperatur in Intervallen erhöht und nach jedem Intervall oder kontinuierlich erfolgt eine Fluoreszenz-Messung. Durch den Temperaturanstieg trennen sich die DNA-Doppelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte auf und verlieren den SYBR-Green® Farbstoff, wodurch die Fluoreszenz abnimmt. Die daraus entstehende Fluoreszenzabnahme wird detektiert. Aufgrund der für die jeweiligen PCR-Produkte spezifischen Schmelztemperaturen kann man zwischen spezifischen und unspezifischen Amplifikaten oder Primerdimeren unterscheiden.

Zur Quantifizierung der *Template* Menge wird nicht die gesamte Menge an entstandenem PCR-Produkt betrachtet, sondern die Kinetik der PCR analysiert. Hierzu wird für die sigmoidale Amplifikationskurve, welche aus den Fluoreszenz-Messungen resultiert, der CT-Wert bestimmt. Der CT-Wert (*threshold cycle* = “Schwellenwert-Zyklus”) entspricht der Zyklenzahl, welche notwendig ist ein definiertes Fluoreszenzsignal oberhalb des Hintergrundsignals zu erreichen. Bei der Auswertung wird daher nicht betrachtet wie viel PCR-Produkt nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen entstanden ist, sondern wie viele

Zyklen in der jeweiligen Probe nötig sind, bis das Fluoreszenzsignal einen bestimmten definierten Schwellenwert erreicht hat. Durch diese Methode werden die CT-Werte untereinander vergleichbar.

Eine relative Quantifizierung der Expression eines Zielgens kann dadurch erfolgen, dass die CT-Werte des Zielgens gegen die Expression eines Referenzgens normalisiert und auf eine Kontrolle bezogen werden. Als Referenzgene werden oftmals nicht regulierte *house-keeping* Gene wie GAPDH, ribosomale Untereinheiten oder β -Actin verwendet. Unter der Annahme, dass die PCR-Effizienzen von Ziel- und Referenzgen identisch sind, kann dann die relative Expressionsrate (R) des Zielgens nach Gleichung 8.2. berechnet werden (Livak and Schmittgen, 2001). Werte größer oder kleiner 1 bedeuten hierbei eine n-fache Änderung (*fold change*) der Expression des Zielgens, bezogen auf eine Kontrolle und normalisiert zum Referenzgen.

$$[8.2.] \quad R = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

R = relative Expressionsrate [*fold change*]
 $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Probe}} - \Delta CT_{\text{Kontrolle}}$
 $\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$

Gl. 8.2.: Berechnung der relativen Expressionsrate (R) nach der „ $\Delta\Delta CT$ - Methode“ (Livak and Schmittgen, 2001).

Sollen bei der Auswertung die PCR-Effizienzen (E) der jeweiligen Reaktionen miteinbezogen werden, so kann die Effizienz der PCR aus einer Verdünnungsreihe der *Template* cDNA ermittelt werden. Hierbei werden die gemessenen CT-Werte der Verdünnungsstufen gegen den Logarithmus der eingesetzten *Template* Menge aufgetragen. Aus dieser Standardgeraden kann nach Gleichung 8.3. die Effizienz abgeleitet werden (Rasmussen, 2001). Bei einer Effizienz von 100%, bei der sich in jedem Zyklus der PCR die Amplifikate verdoppeln, entspricht dies einem Idealwert von 2. Die relative Expressionsrate (R) kann dann nach einem effizienz-korrigiertem relativen Quantifizierungsmodell nach Gleichung 8.4. berechnet werden (Pfaffl, 2001).

$$[8.3.] \quad E = 10^{[-1/m]}$$

E = PCR-Effizienz
m = Steigung der Standardgeraden

Gl. 8.3.: Berechnung der PCR-Effizienz (E) (Rasmussen, 2001).

$$[8.4.] \quad R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CT_{\text{Zielgen}}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CT_{\text{Referenzgen}}}}$$

R = relative Expressionsrate [*fold change*]
E = PCR-Effizienz
 $\Delta CT_{\text{Zielgen / Referenzgen}} = CT_{\text{Kontrolle}} - CT_{\text{Probe}}$

Gl. 8.4.: Berechnung der relativen Expressionsrate (R) nach einem effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsmodell (Pfaffl, 2001).

Für die Erstellung eines Expressionsprofils der RdRPs während der Entwicklung von *D. discoideum* wurde cDNA, welche aus unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten gewonnen wurde, verwendet (vgl. Abschnitt 8.1.10; 8.3.7.). Zur Bestimmung der PCR-Effizienzen konnte eine 5-stufige 1 : 5 Verdünnungsreihe der jeweils verwendeten cDNA in dH₂O erstellt werden. cDNA bzw. Verdünnungsreihen wurden, in den in Tabelle 8.9. angegebenen Reaktionsansatz, eingesetzt. Die qPCR erfolgte im Mastercycler ep realplex (Eppendorf) unter den in Tabelle 8.10. angegebenen Reaktionsbedingungen. Als interner Standard für eine relative Quantifizierung wurde *cinD-1* verwendet (Damer et al., 2007). Hierbei flankierten die verwendeten Primer ein Intron des Gens, wodurch Kontaminationen der cDNA mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte.

Tab. 8.9.: Reaktionsansatz für qPCR.

Komponente	Ausgangskonzentration	PCR-Ansatz
Template cDNA bzw. Verdünnungsreihe	---	2 µL
PCR Puffer (+MgCl ₂ , KCl)	10x	2,5 µL
dNTPs	2 mM	2,5 µL
5'-Primer	5 µM	1 µL
3'-Primer	5 µM	1 µL
EvaGreen ^(R) Fluorescent DNA stain	50x	0,5 µL
Taq DNA Polymerase	1 u/µL	0,5 µL
dH ₂ O	----	15 µL
Gesamtvolumen	----	25 µL

Tab. 8.10.: qPCR-Programm für die Quantifizierung der RdRPs.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
1	95°C	5 min	1
2	95°C	15 sec	40 ^a
3	58°C	30 sec	(von Schritt 2 – 4)
4	60°C	30 sec	
5	95°C	15 sec	
6	60°C	15 sec	Schmelzkurvenanalyse ^b
7	60°C – 95°C	20min	(von Schritt 5 – 8)
8	95°C	15 sec	

^a Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte nach jedem Zyklus der qPCR.

^b Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte kontinuierlich während der Schmelzkurvenanalyse.

8.3.9. Herstellung von Gendeletionsvektoren mittels pKOSG System

Um Gendeletionsvektoren für *D. discoideum* effizienter herstellen zu können, wurde basierend auf dem pLPBLP Vektorsystem (Faix et al., 2004) das pKOSG System (Wiegand et al., 2011) entwickelt (vgl. Abschnitt 9.4.1.). Ausgehend von den PCR-Produkten der Bereiche für die homologe Rekombination (linker Arm, rechter Arm) kann hierbei durch *combinatorial cloning* in einer Einschritt-Reaktion, direkt ein Gendeletionsvektor hergestellt werden.

Zur Herstellung von Gendeletionsvektoren mittels pKOSG System wurden linker und rechter Arm mit angehängten *StarCombinase* Bindestellen und *combinatorial sites* (vgl. Tab. 9.7.) durch PCR von genomischer DNA amplifiziert werden (vgl. Abschnitt 8.3.6. PCR-Ansatz I). Zur Entfernung von Primerdimeren etc. wurde ein „PCR *clean up*“ mit dem NucleoSpin® ExtractII Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alternativ wurden die PCR-Produkte durch Gelelution aufgereinigt (vgl. Abschnitt 8.3.2.3.). Durch photometrische Quantifizierung und durch Vergleich der aufgereinigten DNA-Fragmente in einem Agarosegel mit definierten Mengen eines Größenstandards erfolgte die Quantifizierung. Beim *combinatorial cloning* sind exakte Quantifizierung und hohe Reinheit der PCR-Produkte für eine effiziente Reaktion mit einer hohen Ausbeute korrekter Vektoren essentiell. Die aufgereinigten und quantifizierten DNA-Fragmente (linker bzw. rechter Arm) wurden mit den in Tabelle 8.11. angegebenen Komponenten versetzt und der Ansatz für 1 h bei 30°C inkubiert. Nachfolgend wurden 10 µL des Reaktionsansatzes in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Die verbleibende Lösung konnte als Reserve bei 4°C gelagert werden.

Tab. 8.11.: Reaktionsansatz zur Herstellung eines Gendeletionsvektors mittels pKOSG System.

Komponente	Menge
pKOSG-IBA-Dictyl	10 µL
PCR Produkt 1 (linker Arm)	15 ng
PCR Produkt 2 (rechter Arm)	15 ng
Star Solution A1	1 µL
Star Solution A2	1 µL
Star Solution A3	1 µL
dH ₂ O	ad 25 µL

Die erhaltenen Klone wurden mittels Plasmidminipräparation analysiert. Dabei wurden die Plasmide durch Restriktionsspaltung mit der in die Primersequenz eingefügten Restriktionsschnittstellen, analysiert. Bei korrekten Klonen konnte die Sequenz von linkem bzw. rechtem Arm durch Sequenzierung mit den Primern #0163 / #0164 validiert werden.

8.3.10. Southern Blot

Mittels Southern Blot Analysen können bestimmte DNA Sequenzen spezifisch nachgewiesen werden (Southern, 1975). Soll ein bestimmter Bereich innerhalb eines Genoms nachgewiesen werden, wird die aufgereinigte genomische DNA zunächst mit geeigneten Restriktionsendonukleasen gespalten und die Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach alkalischer Denaturierung der doppelsträngigen DNA im Agarosegel werden die Fragmente mittels Kapillartransfer auf eine Membran übertragen. Nach Immobilisierung der DNA-Fragmente durch UV Behandlung kann mittels Einsatz einer komplementären, radioaktiv markierten Sonde ein spezifischer DNA-Abschnitt nachgewiesen werden.

Durch Southern Blot Analysen wurden *knock out* Stämme, ergänzend zu den durchgeführten PCR-Analysen, validiert. Hierfür wurden 15 – 30 µg aufgereinigte genomische DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen in einem präparativen Ansatz gespalten und die Fragmente durch Phenol/Chloroform Extraktion und anschließender Fällung aufgereinigt. Diese Nukleinsäuren wurden in einem 1%igen Agarosegel bei max. 3 V/cm aufgetrennt. Die alkalische Denaturierung der Nukleinsäuren erfolgte durch Inkubation des Agarosegels in Denaturierungslösung für mindestens 30 min auf einer Schwenkplatte. Nachfolgend wurde die Denaturierungslösung durch Neutralisierungslösung ersetzt und das Agarosegel abermals für 30 Minuten schwenkend inkubiert.

Anschließend erfolgte der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten und denaturierten Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Roti®-Nylon plus) mittels Kapillarblot. Dieser Transfer wurde, wie in Abbildung 8.1. dargestellt, aufgebaut und über Nacht durchgeführt.

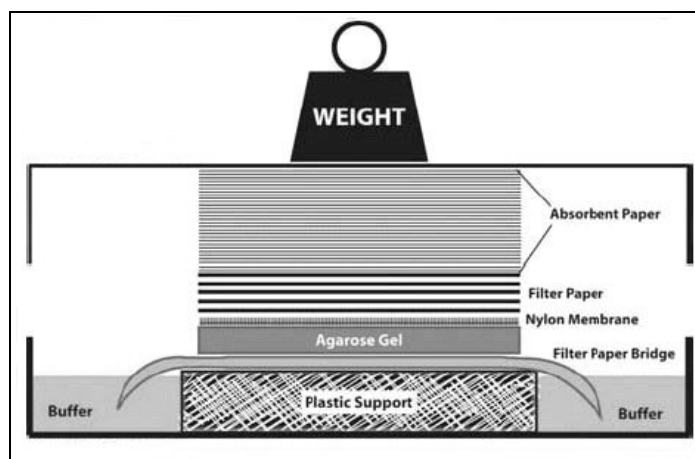


Abb. 8.1.: Aufbau eines Kapillar-Blots. Auf eine Auflage wird eine Whatmann Papier als Kapillarbrücke in einer Schale platziert. Hierauf wird das Agarosegel gelegt. Um einen „Kurzschluss“ des Blots zu verhindern, wird eine Barriere aus Parafilm um das Gel aufgebaut. Es folgen die Nylonmembran und 3 Lagen Whatmann Papier in der Größe des Agarosegels. Dieser Aufbau muss luftblasenfrei erfolgen. Darauf werden ein Stapel Papiertücher und eine Glasplatte mit Gewicht platziert. Durch Kapillarkräfte wird der Transferpuffer (20x SSC) über die Kapillarbrücke durch das Gel in die Papiertücher gesogen, wodurch die Nukleinsäuren aus dem Agarosegel auf die Membran übertragen werden (Abb. <http://www.gbiosciences.com/Image/BE315.jpg>).

Nach erfolgtem Transfer wurde die DNA mittels UV-Licht (0,5 Joule/cm²) an die Nylonmembran gebunden. Nach Überführung der Membran in eine Hybridisierungsröhre, erfolgte die Prähybridisierung in Denhardt-Puffer für mindestens 1 h. Nachfolgend wurde die aufgereinigte radioaktiv markierte und denaturierte Sonde hinzugegeben und über Nacht hybridisiert.

Zur Reduktion des Hintergrundsignals wurde der Blot nach erfolgter Hybridisierung gewaschen. Hybridisierungs- und Waschbedingungen für die verwendeten Sonden werden in Abschnitt 8.3.14. aufgeführt. Zur Auswertung mit dem Phosphor Imager wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und auf einen Imager-Screen exponiert.

8.3.11. Northern Blot

Analog zu Southern Blot Analysen können in Northern Blot Analysen RNA-Moleküle mit Hilfe einer komplementären, radioaktiv markierten Sonde in Gesamt-RNA detektiert werden (Alwine et al., 1977). Eine Denaturierung der RNA und Inhibition von RNasen kann hierbei durch die chaotrope Wirkung von Guanidinthiocyanat (GTC) erfolgen.

Mittels Gelelektrophorese wurden 10 µg aufgereinigte Gesamt-RNA in einem 1,2%igen GTC-Agarosegel aufgetrennt. Analog zum Southern Blot erfolgte der Transfer mittels Kapillarblot und die Immobilisierung der RNA an der Nylonmembran (Roti[®]-Nylon plus) wurde mittels UV-Licht (0,5 Joule/cm²) durchgeführt. Bei Northern Blot Analysen wurden Prähybridisierung und Hybridisierung in Church-Puffer durchgeführt. Die jeweils verwendeten Hybridisierungs- und Waschbedingungen werden in Abschnitt 8.3.14. aufgeführt. Durch Inkubation der Membran in *Stripping*-Lösung (2x für 1 h bei 95°C) konnten Sonden wieder entfernt werden und nachfolgend die Membran erneut mit einer anderen Sonde hybridisiert werden. Um quantitative Northern Blot Analysen durchführen zu können, wurden abschließend alle Northern Blots mit einer Ladekontrolle (Nachweis Actin6 mRNA oder U6 RNA) hybridisiert.

8.3.12. Northern Blot zum Nachweis kleiner RNAs

Um kleine RNAs in Gesamt-RNA von *D. discoideum* mittels Northern Analyse nachweisen zu können, wurden zwei unterschiedliche Nachweisverfahren eingesetzt (Hinas et al., 2007; Pall et al., 2007). Nach Auftrennung der Gesamt-RNA in einem Polyacrylamidgel und Transfer mittels Elektro-Blots konnte die RNA entweder durch UV-*Crosslinking* oder durch chemisches *Crosslinking* immobilisiert werden. Vorteil des UV-*Crosslinking* ist, dass sämtliche auf die Membran transferierten RNA-Moleküle gebunden werden können, jedoch ist diese Methode weniger sensitiv als chemisches *Crosslinking*. Hierbei können in einer Carbodiimid-vermittelten *Crosslinking* Reaktion RNA-Moleküle kleiner als 40 nt sehr sensitiv gebunden werden. Für diese Reaktion ist jedoch eine terminale Phosphatgruppe notwendig, wodurch nur RNA-Moleküle, welche diese aufweisen, gebunden werden. Im Vergleich ist dieses Nachweiseverfahren 20 – 50 mal sensitiver (Pall et al., 2007).

8.3.12.1. Northern Blot mit UV-*Crosslinking* zum Nachweis kleiner RNAs

Zum Nachweis kleiner RNAs mittels Northern Blot Analyse mit UV-*Crosslinking* wurden 20 µg Gesamt-RNA in einem 10%igen TBE PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran (Amersham HybondTM-N+) mittels Elektro-Blot im *wet-blot* Verfahren. Dieser wurde luftblasenfrei in 1x TBE Puffer, wie in Abbildung 8.2. dargestellt, aufgebaut. Der Transfer wurde für 12 – 16 h bei 20 V und 4°C in 1x TBE Puffer durchgeführt. UV-*Crosslinking* erfolgte mit 0,5 Joule/cm².

Die nachfolgende Prähybridisierung und Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden erfolgte in Churchpuffer unter den in Abschnitt 8.3.14. angegebenen Bedingungen. Auch hier konnten Membranen nach *Stripping* mehrfach hybridisiert werden. Zur quantitativen Auswertung wurde als Ladekontrolle U6 RNA nachgewiesen.

8.3.12.2. Northern Blot mit chemischen *Crosslinking* zum Nachweis kleiner RNAs

Abweichend zum obigen Verfahren wurden bei Northern Analysen mit chemischen *Crosslinking* 20 µg Gesamt-RNA in einem 11%igen MOPS PAA-Gel aufgetrennt. Der Elektro-Blot der aufgetrennten Gesamt-RNA auf die Nylonmembran (Amersham HybondTM-NX) erfolgte hierbei im *semi-dry* Verfahren in dH₂O für 10 min bei 20 V.

Zur Herstellung der *Crosslinking*-Lösung wurden zunächst 204 µL Methylimidazol (12,5 M) in 8 mL dH₂O gegeben und ein pH-Wert von 8,0 mit HCL (15%) eingestellt. Dann konnten 0,622 g EDC (N-(3-Dimethylamioethyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid) darin gelöst werden. Abschließend wurde der Ansatz mit dH₂O auf 20 mL Endvolumen aufgefüllt. Die instabile *Crosslinking*-Lösung kann nicht gelagert werden und wurde daher unmittelbar vor der Verwendung hergestellt. Zum Carbodiimid-vermittelten *Crosslinking* wurde ein Whatmann Papier in der Größe der Membran in *Crosslinking*-Lösung getränkt und nachfolgend die Membran mit der transferierten RNA darauf platziert. Dies wurde in Plastikfolie eingeschweißt und für 2 Stunden bei 55°C in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Im Anschluss wurde zur Entfernung von überschüssigen EDC die Membran 2x in dH₂O gespült.

Die nachfolgende Detektion erfolgte analog zu Northern Blot Analysen mit UV-*Crosslinking*. Als Ladekontrolle wurde jedoch DdR-6 (snoRNA) verwendet, da U6 RNA keine terminale Phosphatgruppe aufweist. Eine mehrfache Hybridisierung der Membranen nach *Stripping* war auch bei dieser Methode möglich.

8.3.13. Herstellung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren

8.3.13.1. Random-primed Labeling von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung von längeren radioaktiv markierten DNA-Fragmenten wurde Random-primed Labeling eingesetzt. Bei dieser Methode wird der DNA-Doppelstrang zunächst denaturiert, wodurch die eingesetzten Hexa-Radom-Primer hybridisieren können. In der Labeling Reaktion werden dann durch das Klenow Fragment die Primer verlängert und hierbei die verwendeten radioaktiven Nukleotide inkorporiert (Feinberg and Vogelstein, 1983). Das Klenow-Fragment ist die C-terminale Untereinheit der bakteriellen Polymerase I aus *E. coli* und besitzt 5' - 3' Polymeraseaktivität und 3'-5' Exonukleaseaktivität.

Für die Markierungsreaktion wurden zunächst dH₂O, DNA *Template* und OLB-Mix zusammengegeben und für 10 min auf 95°C inkubiert. Nachfolgend wurden die restlichen Komponenten (vgl. Tab. 8.12.) hinzugegeben und der Ansatz für 1-2 h auf 37°C inkubiert. Nicht inkorporierten Nukleotiden konnten mittels Gelfiltration von der Sonde abgetrennt werden. Um möglichst spezifische Sonden für Southern oder Northern Blots mit dieser Methode zu erhalten, wurden nur im Agarosegel aufgereingte PCR-Produkte oder DNA-Fragmente von Restriktionsspaltungen eingesetzt.

Tab. 8.12.: Reaktionsansatz für Random-primed Labeling von DNA-Fragmenten.

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
DNA <i>Template</i>	1 µg/µL	5 µL
OLB-Mix	5x	10 µL
BSA	10 mg/mL	2 µL
[α- ³² P] dATP (3000 Ci/mmol)	3,3 µM	5 µL
Klenow Fragment	10 u/µL	2 µL
dH ₂ O	-----	26 µL
Gesamtvolumen	-----	50 µL

8.3.13.2. 5'-End-Labeling von Oligonukleotiden und DNA-Fragmente mit T4 PNK

Das Enzym T4 Polynukleotid Kinase (T4 PNK) katalysiert in der *forward* Reaktion die Übertragung des γ-Phosphats von ATP auf die 5'OH-Gruppe von einzel- oder doppelsträngigen DNA-Fragmenten und Oligonukleotiden. Da diese Reaktion reversibel ist, kann in Gegenwart von ADP eine Umkehr der Reaktion (*exchange* Reaktion) stattfinden.

Die *forward* Reaktion wurde für 5'-End-Labeling von Oligonukleotiden, welche als Sonden für Northern Blots verwendet werden konnten, oder zur Herstellung eines radioaktiv markierten Größenstandards (pUC19 Marker) eingesetzt. Hierfür wurden, die in Tabelle 8.13. angegebenen Komponenten, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und für 30 min bei 37°C

inkubiert. Nachfolgend wurden nicht inkorporierte Nukleotide durch Aufreinigung über eine Sephadex G50-Säule vom Marker bzw. Oligonukleotid abgetrennt.

Tab. 8.13.: Reaktionsansatz für 5'-End-Labeling von Oligonukleotiden und DNA-Fragmente mit T4 PNK.

Komponente	Ausgangs-konzentration	5'-End-Labeling Oligonukleotid Sonde	5'-End-Labeling pUC19 Marker
Oligonukleotid	2 μ M	4 μ L	---
pUC19 DNA/ <i>Msp</i> I Marker	0,5 μ g/ μ L	---	4 μ L
T4 PNK Puffer A	10x	2 μ L	2 μ L
[γ - 32 P] ATP (5000 Ci/mmol)	2 μ M	5 μ L	2 μ L
T4 Polynukleotid Kinase	10 u/ μ L	1 μ L	1 μ L
dH ₂ O	----	8 μ L	11 μ L
Gesamtvolumen	----	20 μ L	20 μ L

8.3.13.3. *In vitro* Transkription

Mit Hilfe der *in vitro* Transkription können unmarkierte oder radioaktiv markierte RNA-Moleküle hergestellt werden. Radioaktive *in vitro* Transkripte konnten als strangspezifische Sonden in Northern Blots eingesetzt werden.

Hierfür wurde im Vorfeld die Sequenz der Sonde in gewünschter Orientierung (mit angehängter T7-Promotorsequenz für die T7 RNA Polymerase) in den pJET1/blunt Vektor kloniert und nachfolgend die Sequenz durch Sequenzierung bestätigt. Durch Restriktionsspaltung mit den Enzymen *Xba* I und *Xho* I konnte dann das DNA *Template* für die *in vitro* Transkription generiert werden. Nach Aufreinigung wurde dieses, in den in Tabelle 8.14. aufgeführten Reaktionsansatz, eingesetzt. Die *in vitro* Transkription erfolgte für 2 h bei 37°C. Nachfolgend wurden die entstandenen *in vitro* Transkripte über eine Sephadex G-50 Säule aufgereinigt, um nicht inkorporierte Nukleotide von den Transkripten zu trennen. Zur Kontrolle der Qualität der Sonde konnte vor oder nach der Hybridisierung ein Aliquot auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden.

Tab. 8.14.: Reaktionsansatz für radioaktive *in vitro* Transkription.

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
DNA <i>Template</i>	100 ng/ μ L	2 μ L
Transkriptionspuffer	10x	5 μ L
rATP, rCTP, rGTP	je 5 mM	5 μ L
rUTP	1 mM	5 μ L
[α - 32 P] UTP (5000 Ci/mmol)	3,3 μ M	1 μ L
RiboLock™ RNase Inhibitor	40 u/ μ L	1 μ L
T7 RNA Polymerase	20 u/ μ L	1 μ L
dH ₂ O	----	30 μ L
Gesamtvolumen	----	50 μ L

8.3.14. Verwendete Sonden und Hybridisierungsbedingungen

Aufgrund der Vielzahl der verwendeten Sonden wurden zur Unterscheidung alle Sonden welche mittels Random-primed Labeling von DNA Fragmenten hergestellt wurden, als OLB Sonden bezeichnet. Strangspezifische Sonden, welche durch 5'-End-Labeling aus Oligonukleotiden entstanden, wurden als Oligo Sonden bezeichnet. Durch *in vitro* Transkription hergestellte strangspezifische Sonden erhielten die Bezeichnung Ribo Sonden.

Waschschritte für OLB Sonden, welche in Southern oder Northern Blot Analysen eingesetzt wurden, erfolgten für je 1 h in Waschlösung A und in Waschlösung B bei den in Tabelle 8.17. und 8.18. aufgeführten Temperaturen. Für alle Ribo und Oligo Sonden sowie OLB Sonden, welche zum Nachweis von kleinen RNAs eingesetzt wurden, erfolgten jeweils zwei Waschschritte für 15 min in Waschlösung I gefolgt von 2x 10 min in Waschlösung II und 2x 5 min in Waschlösung III unter den in Tabelle 8.15. – 8.17. angegeben Temperaturen. Die angegebenen Expositionszeiten beziehen sich auf Sonden mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 10^8 cpm/ug RNA bzw. DNA.

Tab. 8.15.: Ribo Sonden zum strangspezifischen Nachweis von DIRS-1 Transkripten.

Ribo Sonde ^a	Nachweis ^a	Größe	Hybridisierungs- / Waschtemperatur	Expositions- zeit
DIRS-1 LE s	DIRS-1 LE <i>sense</i> Transkripte	312 nt	60°C / 65°C	≥ 1 Tag
DIRS-1 LE as	DIRS-1 LE <i>antisense</i> Transkripte	313 nt	60°C / 60°C	5 Tage
DIRS-1 RE s	DIRS-1 RE <i>sense</i> Transkripte	305 nt	60°C / 65°C	≥ 1 Tag
DIRS-1 RE as	DIRS-1 RE <i>antisense</i> Transkripte	305 nt	60°C / 60°C	5 Tage

^a Vektoren, welche als *Template* eingesetzt wurden, sind in Abschnitt 13.1.1. dokumentiert.

Tab. 8.16.: Oligo Sonden für Northern Blot Analysen.

Oligo Sonde	Primer Nr.	Nachweis	Hybridisierungs- / Waschtemperatur	Expositions- zeit
SW101	#1205	cadA mRNA	42°C / 42°C	≥ 1 Tag
SW102	#1206	cadA as Konstrukt	42°C / 42°C	≥ 1 Tag
SW103	#1207	cadA as Konstrukt	42°C / 45°C	≥ 1 Tag
SW120	#1390	β-gal siRNAs von β-gal hp Konstrukt	42°C / 42°C	≥ 1 Tag
SW122	#1392	β-gal as Konstrukt	42°C / 42°C	3 Tage
SW123	#1393	β-gal as Konstrukt	42°C / 42°C	3 Tage
SW130	#1425	β-gal mRNA (5'Ende)	42°C / 57°C	≥ 1 Tag
SW148	#1513	β-gal mRNA (3'Ende)	42°C / 57°C	2 Tage
DIRS-1 LE siRNAs	#1201	DIRS-1 siRNAs	42°C / 42°C	≥ 1 Tag
DIRS-1 RE siRNAs	#1202	DIRS-1 siRNAs (Hinas et al., 2007)	42°C / 42°C	3 Tage
SW99	#1203	Skipper siRNAs (Hinas et al., 2007)	42°C / 42°C	4 – 7 Tage
mica1190	#1514	mica1190 (Hinas et al., 2007)	42°C / 42°C	4 – 7 Tage
mica1198	#1515	mica1198 (Hinas et al., 2007)	42°C / 42°C	4 – 7 Tage
DdR-6	#1647	DdR-6 snoRNA (Aspegren et al., 2004)	42°C / 42°C	≥ 8 h
U6	#1200	U6 snRNA (Hinas et al., 2006)	42°C / 42°C	≥ 6 h

Tab. 8.17.: OLB Sonden für Northern Blot Analysen.

OLB Sonde	Nachweis (DNA Fragment ^a ; Primer zur Amplifikation)	Größe	Hybridisierungs- / Waschtemperatur	Expositions- zeit
cadA mRNA	cadA mRNA (/ #0329)	308 bp	42°C / 52°C	≥ 1 Tag
cadA siRNAs I	siRNAs cadA hpII / as Konstrukt (cadA hpII s Fragment; #1387 / #1388)	547 bp	42°C / 42°C	≥ 1 Tag
cadA siRNAs II	siRNAs cadA hpIII / IV Konstrukt (cadA hpIII as Fragment; #1491 / #1492)	217 bp	42°C / 42°C	3 – 5 Tage
β-gal siRNAs 5'upstream	siRNAs 5'upstream von β-gal hp (#1494 / #1495)	470 bp	42°C / 45°C	1 – 2 Tage
β-gal siRNAs	siRNAs β-gal as Konstrukt (β-gal as Fragment; #0190 / #0191)	997 bp	42°C / 42°C	3 Tage
siRNAs GFP loop	siRNAs GFP loop in β-gal hp Konstrukt (GFP loop Fragment; #0188 / #0189)	148 bp	42°C / 42°C	3 Tage
actin6 mRNA	actin6 mRNA (#1198 / #1199)	275 bp	50°C / 54°C	≥ 1 Tag

^a DNA Fragmente, welche in die Random-primed Labeling Reaktion eingesetzt wurden, konnten mittels PCR unter Verwendung der angegebenen Primer amplifiziert werden. Wurde das DNA-Fragment im Vorfeld bereits kloniert, konnte es aus diesem Vektor mittels präparativen Verdau heraus gespalten und aufgereinigt werden.

Tab. 8.18.: OLB Sonden für Southern Blot Analysen.

OLB Sonde	DNA Fragment ^a (Primer zur Amplifikation)	Größe	Nachweis	Hybridisierungs- / Waschtemperatur	Expositions- zeit
rrpA	rrpA LA ^c (Teilbereich) (#1047 / #1142)	521 bp	<i>rrpA</i> , <i>rrpB</i>	42°C / 48°C	≥ 1 Tag
rrpB	rrpA RA ^c (Teilbereich) (#1044 / #1048)	529 bp	<i>rrpA</i> , <i>rrpB</i>	42°C / 48°C	≥ 1 Tag
rrpC	rrpC RA ^c (#1050 / #1053)	485 bp	<i>rrpC</i>	42°C / 48°C	≥ 1 Tag
rrpA ^Δ / rrpB ^Δ	rrpA RA ^d Teilbereich (#0035 / #0025)	364 bp	<i>rrpA</i> , <i>rrpB</i>	42°C / 50°C	≥ 1 Tag
lox ^Δ / rox ^Δ	rrpA LA ^d (Teilbereich) (/ #0034)	389 bp	<i>rrpA</i> , <i>rrpB</i>	42°C / 50°C	≥ 1 Tag
rrpC ^Δ	rrpC RA ^d (/ #0029)	783 bp	<i>rrpC</i>	42°C / 60°C	1 – 3 Tage
BS ^(r)	BS ^(r) (#1502 / #1503)	414 bp	BS ^(r)	42°C / 48°C	≥ 1 Tag

^a DNA Fragmente, welche in die Random-primed Labeling Reaktion eingesetzt wurden, konnten mittels PCR unter Verwendung der angegebenen Primer amplifiziert werden. Wurde das DNA-Fragment im Vorfeld bereits kloniert, konnte es aus diesem Vektor mittels präparativen Verdau heraus gespalten und aufgereinigt werden.

^c Diese Angaben beziehen sich auf Vektoren zur Herstellung von RdRP *knock out* Stämmen (vgl. Tab. 9.2.).

^d Diese Angaben beziehen sich auf Gendeletionsvektoren (vgl. Tab. 9.8.).

8.4. Proteinbiochemische Methoden

8.4.1. Isolierung von Gesamtprotein aus *D. discoideum*

Die Isolierung von Gesamtprotein aus *D. discoideum* wurde durchgeführt, um Proteine mittels SDS-PAGE aufzutrennen, um nachfolgend in einen Western Blot spezifische Proteine nachweisen zu können. Hierfür wurden 2×10^6 Zellen von einer exponentiell wachsenden Schüttelkultur entnommen und bei $11000 \text{ rcf}/4^\circ\text{C}$ für 3 min pelletiert. Nachfolgend wurde sämtliches Nährmedium abgenommen und das Pellet in $40 \mu\text{L}$ 2x Laemmli-Puffer aufgenommen, so dass sich eine Zellzahl von 5×10^4 Zellen/ μL ergab. Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch 10minütiges Erhitzen auf 95°C . Von dieser Lösung wurden $8 \mu\text{L}$ (Gesamtprotein aus 4×10^5 Zellen) mittels SDS-PAGE analysiert.

8.4.2. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In einer diskontinuierlichen SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden denaturierte und durch SDS negativ geladene Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Eine SDS-PAGE besteht aus einem weitmaschigen Sammelgel (3 - 4%ig) und einem engmaschigen Trenngel (5 – 20%ig). Sammelgel und Trenngel unterscheiden sich zusätzlich in Ionenstärke und pH-Wert, weshalb es am Übergang der Gele zu einer Fokussierung der Proteine kommt. Durch SDS und β -Mercaptoethanol im Laemmli-Puffer werden nichtkovalente Wechselwirkungen und Disulfidbrücken innerhalb der Proteine zerstört. Außerdem bindet SDS an die Proteine, wodurch diese eine negative Ladung proportional zur Masse des jeweiligen Proteins erhalten. Hierdurch ist gewährleistet, dass die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld proportional zur Masse erfolgt.

Für ein 12%iges Trenngel wurden, die in Tabelle 8.18. angegebenen Komponenten, miteinander vermischt und zwischen zwei Glasplatten, welche durch Platzhalter getrennt waren, gegossen. Das Trenngel wurde während der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene Grenzfläche zu erhalten. Nach Entfernen des Isopropanols, wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und diese mit 1x Protein-Laufpuffer befüllt. Zur Charakterisierung der Banden im Gel konnten $5 \mu\text{L}$ Molekulargewichtsmarker bestehend aus einem Gemisch von Standardproteinen verwendet werden. Die Elektrophorese wurde bei

einer Stromstärke von 25 mA pro Gel durchgeführt, bis die Bromphenolblaulauffront des Laemmli-Puffers das untere Ende des Gels erreichte.

Alternativ konnten NuPAGE® Novex® 4 – 12% Bis-Tris Gradientengele (Invitrogen) eingesetzt werden. Hierbei wurde die Elektrophorese nach Angaben des Herstellers in der Xcell-SureLock™-Mini-Cell Apparatur in NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer durchgeführt.

Tab. 8.18.: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel einer SDS-PAGE (Menge für 2 Gele).

Komponente	Sammelgel (3,5%)	Trenngel (7,5 %)	Trenngel (12%)
Wasser	2,5 mL	5,05 mL	3,40 mL
Protein-Trenngelpuffer	-----	2,65 µL	2,65 µL
Protein-Sammelgelpuffer	1 mL	-----	-----
Acrylamid / Bisacrylamid (30%)	450 µL	2,75 mL	4,4 mL
EDTA (250 mM)	16 µL	43 µL	43 µL
APS (20%)	60 µL	120 µL	120 µL
TEMED	4 µL	6 µL	6 µL

8.4.3. Coomassie Färbung

Proteine können in Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Färbelösung unspezifisch angefärbt werden, wodurch quantitative Aussagen über die Lademenge möglich sind. Hierfür wurden die Gele nach dem Lauf in eine Schale mit bidest H₂O überführt und für 10 min auf eine Schwenkplatte inkubiert, um überschüssiges SDS aus dem Gel zu entfernen, da dies die Färbung negativ beeinflusst. Nachfolgend wurde bidest H₂O durch eine kolloidale Coomassie-Färbelösung ersetzt und das Gel mit der Färbelösung auf einen Schüttler über Nacht inkubiert. Die Entfärbung der Gele erfolgte in Coomassie-Entfärbelösung, bis deutliche Proteinbanden zu erkennen waren.

8.4.4. Ponceau-Rot Färbung

Durch Ponceau-Rot Färbung können Proteine nach dem Transfer auf eine Membran unspezifisch angefärbt und somit die Effizienz des Blots überprüft werden. Die Membran wurde hierfür mit Ponceau S überschichtet und für ca. 10 min auf einer Schwenkplatte inkubiert. Nach Entfernen der Lösung konnten die Banden durch Waschen des Blots in 5%iger Essigsäure sichtbar gemacht werden. Da diese Färbung reversibel ist, wurde der Farbstoff nachfolgend durch Waschen in 1x NCP-Puffer wieder vollständig von der Membran entfernt.

8.4.5. Western Blot und immunologischer Nachweis

Western Blot Analysen ermöglichen es, Proteine mittels Elektro-Blot aus einem Polyacrylamidgel auf eine Membran zu transferieren und nachfolgend spezifische Proteine immunologisch zu detektieren (Towbin et al., 1979). Der Elektro-Blot kann im *semi-dry* oder *wet-blot* Verfahren durchgeführt werden.

Bei einem Western Blot wurde zunächst Gesamt-Protein aus *D. discoideum* in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Für den Aufbau des *semi-dry* Elektro-Blots wurde 6x Whatman Papier und die Nitrozellulosemembran (porablot™ NCP) in der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und das Whatman Papier in 1x Protein-Blotpuffer getränkt. Der Aufbau erfolgte, wie in Abbildung 8.2. schematisch dargestellt, wobei eventuell vorhandene Lufteinschlüsse zwischen den Lagen sorgfältig entfernt wurden. Der Transfer von zwei Gelen erfolgte bei 100 mA für 65 min.

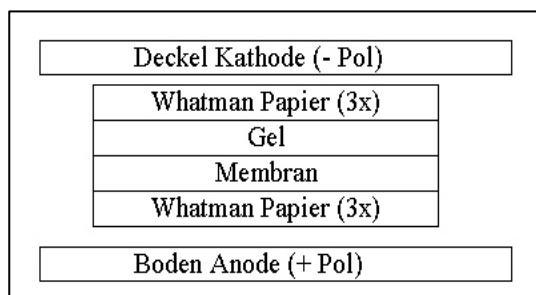


Abb. 8.2.: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Elektro-Blots. Drei Lagen Whatman Papier werden auf die Anode der Blotkassette gelegt, darauf folgen Nitrozellulosemembran, Polyacrylamidgel und erneut 3 Lagen Whatman Papier. Abschließend wird die Blotkassette mit dem Deckel (Kathode) verschlossen. Durch die angelegte Spannung werden die Proteine (oder Nukleinsäuren) aus dem Gel auf die Membran transferiert.

Nach erfolgreichem Transfer konnte eine Ponceau-Rot Färbung der Membran durchgeführt werden und das Polyacrylamidgel in Coomassie-Lösung gefärbt werden.

Für den immunologischen Nachweis spezifischer Proteine wurde die Membran für 1 h in 20 mL Blockierlösung schwenkend präinkubiert. Anschließend wurden 20 mL Blockierlösung mit dem darin verdünnten Erstantikörper auf die Membran gegeben und diese über Nacht bei 4°C auf eine Schwenkplatte inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde der Erstantikörper abgegossen und die Membran dreimal für 10 min in 20 mL 1x NCP-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation des Blots für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 20 mL 1x NCP mit Zweitantikörper. Nach erneutem dreimaligem Waschen für jeweils 10 min in 20 mL 1x NCP-Puffer erfolgte die Detektion der an den Zweitantikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase. Hierfür wurde die Membran für 10 min in 20 mL AP-Puffer geschwenkt und anschließend 50 µL BCIP-Lösung hinzugegeben. Die alkalische Phosphatase Reaktion erfolgte im Dunkeln und ohne Schwenken. Durch Waschen des Blots in dH₂O wurde die Reaktion gestoppt. Die verwendeten Verdünnungen von Erst- und Zweitantikörper sind in Tabelle 8.19. aufgeführt.

Wurde für die SDS-PAGE ein NuPAGE® Novex® 4 – 12% Bis-Tris Gradientengel verwendet, erfolgte der Elektro-Blot im *wet-blot* Verfahren im XCell II™ Blot Module nach den Angaben des Herstellers. Als Blotpuffer wurde dann Novex® Tris-Glycin Transfer-Puffer verwendet.

Tab. 8.19.: Verwendete Verdünnungen von Erst- und Zweitantikörpern für Western Blot Analysen.

Erstantikörper ^a	Verdünnung	Zweitantikörper ^b	Verdünnung
Maus-anti-Coronin	1 : 30	AP-gekoppelter Ziege-anti-Maus	1 : 5000
Maus-anti-Discoidin	1 : 500	AP-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen	1 : 5000
Maus-anti-GFP	1 : 5		
Kaninchen-anti-β-Galactosidase	1 : 100		
Kaninchen-anti-CadA	1 : 32000		
(Srisanthadevan et al., 2009)			

^a Erstantikörper wurden in 5% Magermilchpulver in 1x NCP-Puffer verdünnt.

^b Zweitantikörper wurden in 1x NCP-Puffer verdünnt.

8.4.6. Enzymatischer Nachweis von β-Galactosidase mittels ONPG Assay

Für die Funktionsanalyse der RNA abhängigen RNA Polymerasen in *D. discoideum* wurden transgene Stämme erstellt, die das *lacZ* Gen enthalten (siehe Abschnitt 9.7.). Die Expression des *lacZ* Gens in diesen *D. discoideum* Stämmen kann durch enzymatischen Nachweis der β-Galactosidase Aktivität mittels ONPG Assay quantifiziert werden. Als Nachweisreaktion wird bei diesem Assay das Substrat ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid) durch die β-Galactosidase zu Galactose und o-Nitrophenol hydrolysiert. Die Entstehung des Licht absorbierenden Farbstoffs o-Nitrophenol kann photometrisch quantifiziert werden (Dingermann et al., 1990).

Für den enzymatischen Nachweis von β-Galactosidase im ONPG Assay wurden 2×10^6 Zellen einer exponentiell wachsenden Schüttelkultur entnommen und die Zellen bei 11000 rcf/4°C für 3 min pelletiert und nachfolgend in 2 mL Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 3 min bei 11000 rcf/4°C wurden die Zellen in 200 µL ONPG-Lysepuffer resuspendiert und zur Lyse der Zellen der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden, die in Tabelle 8.20. angegebenen Komponenten des ONPG Assays, in einer Küvette miteinander vermischt. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Tab. 8.20.: Reaktionsansatz ONPG Assay.

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Z-Puffer	1x	800 µL
ONPG-Lösung	4 mg/mL in Natriumphosphatpuffer (100 mM; pH 7,0)	200 µL
Zellysat	1×10^4 Zellen/µL	5 µL

Die Gesamtproteinkonzentration im hergestellten Zelllysate konnte mit Hilfe des Bradford Assays (Bradford, 1976) mit Roti®-Quant (Roth) nach Angaben des Herstellers in Doppelbestimmung ermittelt werden.

Zur quantitativen Auswertung wurde die β -Galactosidase Aktivität im Zelllysate nach Gleichung 8.5. berechnet. Eine Unit (U) ist hierbei definiert als die Menge von Gesamtprotein aus *D. discoideum* (in mg), welche notwendig ist, um 1 μmol ONPG pro Minute bei Raumtemperatur zu hydrolysieren.

$$[8.5.] \quad U = \frac{\Delta E_{405} \cdot V_{\text{total}}}{V_{\text{Protein}} \cdot c_{\text{Protein}} \cdot d \cdot \varepsilon}$$

U	β -Galactosidase Aktivität [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]
ΔE_{405}	Steigung der Absorption [min^{-1}]
V_{total}	Reaktionsvolumen [mL]
V_{Protein}	Zelllysatmenge in der Reaktion [mL]
c_{Protein}	Proteinkonzentration des Zelllysats [$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$]
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
ε	molarer Extinktionskoeffizient [$\triangleq 4,5 \text{ mg} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

Gl. 8.5.: Berechnung der β -Galactosidase Aktivität zur quantitativen Auswertung des ONPG Assays.

9. Ergebnisse

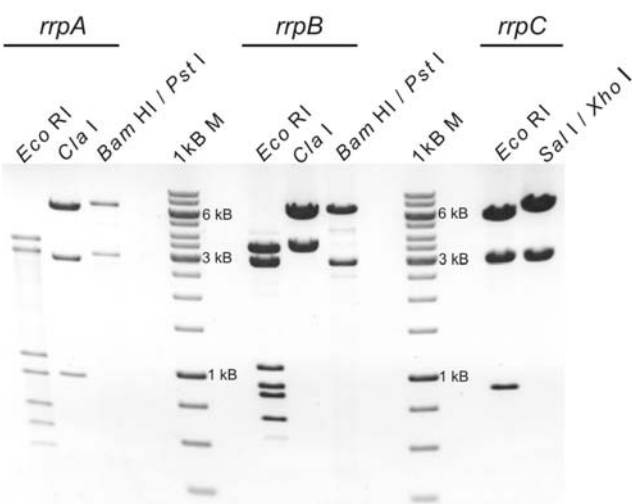
9.1. Klonierung der genomischen Sequenzen der RdRPs

Die genomische Sequenz von *rrpA* ist 7336 bp, von *rrpB* 7308 bp und von *rrpC* 6962 bp lang. Zur Herstellung von RdRP Überexpressionszelllinien in *D. discoideum* mit unterschiedlichen Protein-Tags sollten die genomischen Sequenzen der RdRPs vollständig in einen Expressionsvektor der pDneo2a Serie (Dubin and Nellen, 2010) kloniert werden. Wegen endogener Restriktionsschnittstellen wurde für *rrpA* und *rrpB* eine C-terminale und für *rrpC* eine N-terminale Klonierungsstrategie gewählt. Aufgrund der Größe der genomischen Sequenzen wurden diese nach Amplifikation mittels PCR zunächst über die 3' Adenosin Überhänge der PCR-Produkte in das pGEM[®]-T Easy Vector System I kloniert (vgl. Abb. 9.1.). Nach erfolgreicher Klonierung wurde die gesamte Sequenz durch Sequenzierung überprüft. In Tabelle 9.1. sind die ermittelten Mutationen in den jeweiligen Sequenzen angegeben. Hierbei handelt es sich um Mutationen, welche die Expression nicht beeinflussen sollten. Daher konnte nachfolgend in einer gerichteten Ligation die Sequenz der RdRPs aus den pGEM-T Easy Vektoren heraus gespalten werden und in einen Zielvektor der pDneo2a Serie kloniert werden. Trotz zahlreicher Variationen der verwendeten Ligations- und Transformationsprotokolle gelang diese Klonierung nicht.

Tab. 9.1.: Mutationen der in den pGEM-T Easy Vektor klonierten genomischen Sequenzen der RdRPs.

RdRP	Position	Mutation	Auswirkung
<i>rrpA</i>	+996, +998	Deletion von TAA	Deletion führt zum Verlust einer Aminosäure Asparagin (N) in einem Asparagin Stretch.
	+2365, +2367	Deletion von 3x A	Deletion innerhalb des Introns.
<i>rrpB</i>	+6429	Transversion von T zu C	Transversion von T zu C ändert die Aminosäuresequenz an dieser Position nicht.
<i>rrpC</i>	+202, +204	Deletion von 3x A	Deletion innerhalb des Introns.

^a Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Startcodon im Gen.



9.1. Analytische Restriktionsspaltung, der in den pGEM-T Easy Vektor klonierten genomischen Sequenzen der RdRPs.
Vektorkarten siehe Abschnitt 13.1.2. 1kB M bezeichnet 1kB Marker (#SM0311 Fermentas).
Erwartete Fragmente für *rrpA* (in bp):
Eco RI 91; 393; 543; 685; 953; 1113; 2997; 3589
Cla I 942; 2880; 6542
Bam HI / *Pst* I 30; 2989; 7345
Erwartete Fragmente für *rrpB* (in bp):
Eco RI 91; 682; 922; 936; 1113; 2997; 3648
Cla I 6589; 3747
Bam HI / *Pst* I 7317; 2989; 30;
Erwartete Fragmente für *rrpC* (in bp):
Eco RI 901; 2997; 6094
Sal I / *Xho* I 36; 2987; 6969

9.2. Nachweis und Quantifizierung der Expression der RdRPs während der Entwicklung von *D. discoideum*

Für eine Expressionsanalyse der RdRPs während der Entwicklung von *D. discoideum* mittels qRT-PCR wurde Gesamt-RNA aus AX2 Wildtyp zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten aufgereinigt. Nachfolgend konnte hieraus in einer reversen Transkription unter Verwendung von Oligo(dT)_n Primern cDNA synthetisiert werden. Als endogene Referenz für die relative Quantifizierung wurde *cinD-1* (putativer *helix-turn-helix* Transkriptionsfaktor *H7*) gewählt, da dieses Gen während der Entwicklung konstitutiv exprimiert wird und bereits in anderen Studien als interner Standard verwendet wurde (Singleton et al., 1998). In diesen konnte gezeigt werden, dass *cinD-1* vergleichbar konstitutiv exprimiert wird wie *rnlA* (große Untereinheit der mitochondrialen rRNA) (Damer et al., 2007; Singleton et al., 1998). Ein weiterer Vorteil von *cinD-1* ist, dass im Gegensatz zu ribosomalen RNAs die cDNA Synthese mit Oligo(dT)_n Primern erfolgen kann. Auch flankierten die verwendeten Primer ein Intron, wodurch Kontaminationen der cDNA mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnten. Aufgrund der sehr hohen Sequenzhomologie zwischen *rrpA* und *rrpB* wurde die Spezifität der verwendeten Primer im Vorfeld in den jeweiligen RdRP *knock out* Stämmen verifiziert. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde für alle untersuchten Zeitpunkte durch Erstellung einer Verdünnungsreihe die PCR-Effizienz beim Nachweis von *cinD-1* bestimmt. Zusätzlich wurde in einigen Proben die PCR-Effizienzen für den Nachweis der RdRPs bestimmt. Eine erste Analyse der Rohdaten durch direkten Vergleich der CT-Werte zeigte, dass alle drei RdRPs in vegetativen Zellen und während der gesamten Entwicklung von *D. discoideum* nur sehr schwach exprimiert waren. Da alle ermittelten Effizienzen nur sehr geringe Abweichungen zueinander ergaben, konnte die relative Expressionsrate nach der „ $\Delta\Delta$ CT- Methode“ ermittelt werden (Livak and Schmittgen, 2001). Hierbei erfolgte die Berechnung der relativen Expressionsrate in Bezug auf exponentiell wachsende Zellen in Schüttelkultur (Entwicklungszeitpunkt T0). Die graphische Darstellung (vgl. Abb. 9.2.) der ermittelten relativen Expressionsraten zeigt, dass alle drei RdRPs während der Entwicklung von *D. discoideum* exprimiert werden. Ebenso ist ein deutlicher Anstieg zu Beginn der Entwicklung zu erkennen. Zu späteren Entwicklungszeitpunkten (T9 – T24) ist *rrpB* stärker als *rrpA* und *rrpC* exprimiert. Aufgrund der relativ hohen Varianz der bestimmten Werte und fehlender zusätzlicher biologischer Replikate können keine weitergehenden Aussagen getroffen werden.

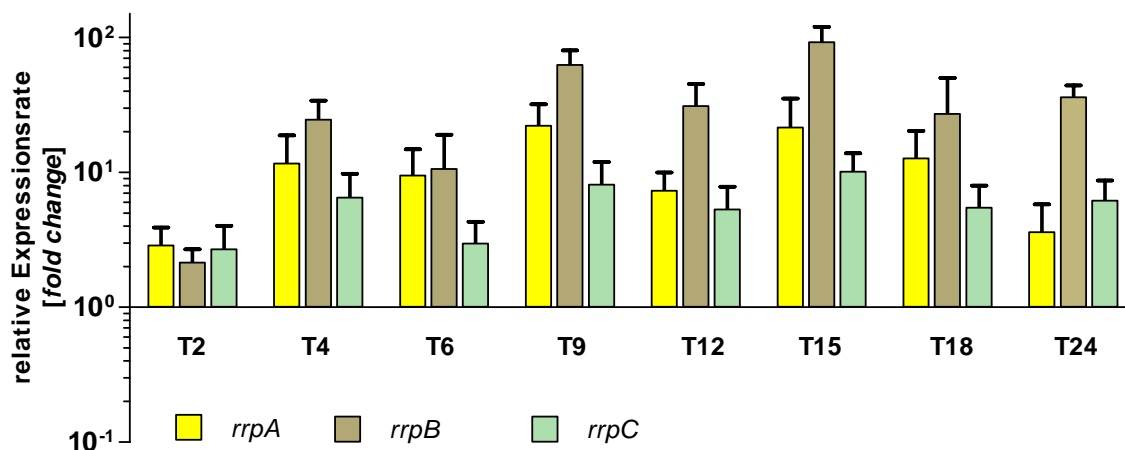


Abb. 9.2.: Relative Expression der RdRPs während der Entwicklung von *D. discoideum*. Zur Analyse der Expression der RdRPs wurde Gesamt-RNA zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten (T0 – T24) aufgereinigt und mittels qRT-PCR die relative Expression bestimmt. Die Berechnung der relativen Expressionsrate erfolgte nach der „ $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode“ relativ zum Referenzgen *cinD-1* und in Bezug auf exponentiell wachsende Zellen in Schüttelkultur (Entwicklungszeitpunkt T0). Die graphische Darstellung beinhaltet Ergebnisse von zwei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Die entsprechenden Standardabweichungen sind als Balken dargestellt.

Nach Abschluss dieser qRT-PCR Expressionsanalysen wurden Genexpressionsdaten für die RdRPs in der Datenbank *dictyExpress*, welche mittels *deep RNA sequencing (RNA-seq)* ermittelt wurden, publiziert (Rot et al., 2009). Diese Daten sind in Abbildung 9.3. graphisch dargestellt. Auch hier ist ein deutlicher Expressionsanstieg zu Beginn der Entwicklung sichtbar. Des Weiteren zeigt der Vergleich der absoluten *RNA-seq* Werte der RdRPs mit *cinD-1*, dass die RdRPs vor allem in vegetativ wachsenden Zellen nur sehr schwach exprimiert sind. Da zur Generierung dieser *RNA-seq* Daten der *D. discoideum* Wildtypstamm AX4 und die Entwicklung auf bakteriellem Substrat (*K. aerogenes*) analysiert wurden, sind weitergehende Vergleiche zwischen qRT-PCR und *RNA-seq* Daten nicht möglich.

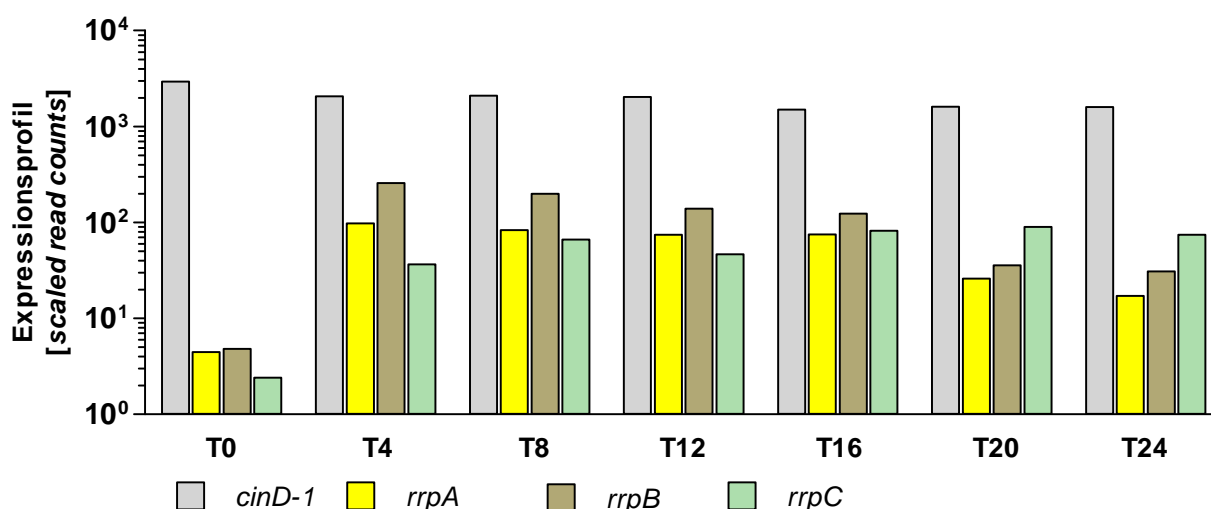


Abb. 9.3.: RNA-seq Expressionsprofil der RdRPs während der Entwicklung von *D. discoideum*. RNA-seq Daten wurden von der Genexpressionsdatenbank für *D. discoideum dictyExpress*, welche mittels *deep RNA sequencing* erstellt wurde, unverändert übernommen (*scaled read counts* = *deep sequencing reads* normalisiert auf *reads* pro 1 Million und pro 1 kB Gensequenz) (vgl. <http://www.ailab.si/dictyExpress>).

9.3. RdRP *knock out* Stämme

RdRP *knock out* Stämme, bei denen keine vollständige Deletion von Helicase bzw. RdRP Domäne erfolgte, werden im Folgenden als RdRP *knock out* Stämme benannt. Stämme mit vollständiger Deletion beider Domänen werden zur Unterscheidung als RdRP Deletionsstämme bezeichnet. Stämme, welche den BS^(r) Selektionsmarker beinhalten, werden mit „lox“ und Stämme ohne Selektionsmarker mit „rox“ bezeichnet.

9.3.1. Herstellung und Verifizierung von RdRP *knock out* Stämmen

Durch homologe Rekombination können Gene in *D. discoideum* unterbrochen oder vollständig deletiert werden (De Lozanne and Spudich, 1987; Witke et al., 1987). Hierzu werden zwei Fragmente oder flankierende genomische Bereiche des auszuschaltenden Gens (rechter bzw. linker Arm), welche nach Klonierung in einen geeigneten Vektor einen Selektionsmarker flankieren, benötigt. Nach Transformation in *D. discoideum* kann dieses *knock out* Konstrukt mit seinen homologen Zielsequenzen rekombinieren. Bei zwei korrekten Rekombinationsereignissen wird der Selektionsmarker integriert und der endogene Bereich zwischen rechtem und linkem Arm deletiert (vgl. Abb. 9.4. A). Um eine Integration des gesamten Vektors durch nur ein Rekombinationsereignis zu unterbinden, werden die Vektoren vor der Transformation durch Restriktionsspaltung linearisiert. Die optimale Länge der Bereiche für homologe Rekombination konnte empirisch auf eine Größe zwischen einigen hundert Nukleotiden bis hin zu einer Kilobase bestimmt werden.

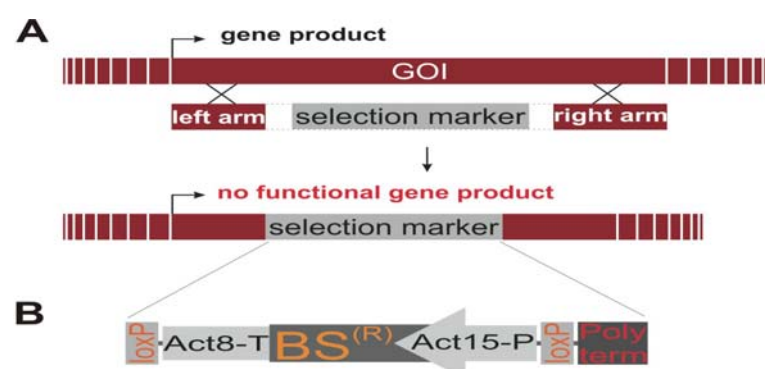


Abb. 9.4.: Knock out von Genen durch homologe Rekombination in *D. discoideum*. A: Darstellung eines linearen *knock out* Konstrukts für *D. discoideum*, bestehend aus zwei Fragmenten des auszuschaltenden Gens (linker bzw. rechter Arm), welche einen Selektionsmarker flankieren. Zwei Rekombinationsereignisse zwischen *knock out* Konstrukt und Zielgen führen zur Integration des Selektionsmarkers in das auszuschaltende Gen.

B: Aufbau des verwendeten Selektionsmarkers (nach Faix et al., 2004). Die BS^(R) Resistenzkassette im Selektionsmarker, welche aus Actin15-Promotor (Act15-P), Blasticidin-Resistenzgen (BS^(r)) und Actin8-Terminator (Act8-T) besteht, wird durch zwei Cre Rekombinase Erkennungssequenzen (*loxP sites*) flankiert. Diese ermöglichen die Entfernung der BS^(R) Resistenzkassette durch eine transiente Expression des Cre Rekombinase Gens. Die Polyterminator Sequenz (Polyterm) dient der Aufrechterhaltung des Gen *knock outs* nach Entfernung des Selektionsmarkers (Abb. nach Wiegand et al., 2011).

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden bereits Vektoren zur Herstellung von RdRP *knock out* Stämmen generiert (vgl. Tab. 9.2.). Die Vektoren rrpA KO BS^(r) und rrpB KO BS^(r) ermöglichen eine Integration des Selektionsmarkers in die RdRP Domäne, erzeugen aber keine Deletion im Gen. Auch kann der Selektionsmarker nach erfolgreichem *knock out* nicht entfernt werden. Eine 2004 publizierte Methode ermöglicht das Entfernen des BS^(r) Selektionsmarkers durch transiente Expression des Cre Rekombinase Gens in *D. discoideum* (Faix et al., 2004). Hierzu wird der BS^(r) Selektionsmarker von Cre Rekombinase Erkennungssequenzen (*loxP sites*) flankiert. Zur Aufrechterhaltung des Gen *knock outs* wird nach Entfernen des Selektionsmarkers ein Polyterminator (translationale Stopp Kasette), welcher nicht entfernt wird, in das *knock out* Konstrukt integriert (vgl. Abb. 9.4. B). Um dieses Cre-*loxP* Rekombinationssystem für die Herstellung von RdRP *double* und *triple knock out* Stämmen nutzen zu können, wurden ausgehend von den Vektoren rrpA KO BS^(r) und rrpB KO BS^(r) in der Abteilung Genetik der Universität Kassel die Vektoren pLPBLP rrpA KO cre-lox BS^(r) und pLPBLP rrpB KO cre-lox BS^(r) hergestellt, welche eine teilweise Deletion der RdRP Domäne verursachen. Zusätzlich wurde für *rrpC* der Vektor pLPBLP rrpC KO cre-lox BS^(r) generiert, welcher eine teilweise Deletion der Helicase Domäne ermöglicht (Details zur Klonierungsstrategie vgl. Abschnitt 13.1.3.).

Tab. 9.2.: Vorhandene Vektoren zur Herstellung von RdRP *knock out* Stämmen.^a

Gen	<i>knock out</i> Vektor ^b	Position linker Arm im Gen ^c	Position rechter Arm im Gen ^c	erzeugte Deletion	Urheber
<i>rrpA</i>	rrpA KO BS ^(r)	+3505, +4302	+ 4303, +5284	—	Martens et al., 2002
	pLPBLP rrpA KO cre-lox BS ^(r)	+3505, +4302	+ 4692, +5284	389 bp	S. Kasten (unveröff.)
<i>rrpB</i>	rrpB KO BS ^(r)	+3564, +4149	+4150, +5340	—	Martens et al., 2002
	pLPBLP rrpB KO cre-lox BS ^(r)	+3564, +4149	+4751, +5340	601 bp	S. Fuhrmann (unveröff.)
<i>rrpC</i>	pLPBLP rrpC KO cre-lox BS ^(r)	+878, +1407	+1458, +1931	50 bp	S. Kasten (unveröff.)

^a Vorhandene Vektoren in der Abteilung Genetik der Universität Kassel.

^b Details zur verwendeten Klonierungsstrategie der *knock out* Vektoren sind im Abschnitt 13.1.3. aufgeführt.

^c Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Start Codon im Gen.

Basierend auf den bereits hergestellten RdRP *knock out* Stämmen, wurden unter Verwendung der in Tabelle 9.2. aufgeführten pLPBLP RdRP KO cre-lox BS^(r) Vektoren alle noch fehlenden RdRP *single*, *double* und *triple knock out* Stämme jeweils mit und ohne Selektionsmarker generiert (vgl. Tab. 9.3.). Zur Herstellung von RdRP *single*, *double* und *triple knock out* Stämme wurden die jeweiligen linearisierten *knock out* Konstrukte zunächst mittels Elektroporation in *D. discoideum* transformiert und nach ausreichender Selektion aus den erhaltenen Transformaten durch Subklonierung Einzelklone erzeugt. Zur Analyse der

Einzelklone mittels PCR konnten Primer 5' *upstream* des linken Arms bzw. 3' *downstream* des rechten Arms der jeweiligen KO Konstrukte eingesetzt werden. In einer ersten Überprüfung wurde mit diesen Primern eine Unterscheidung zwischen Klonen mit Wildtyp RdRP und integriertem *knock out* Konstrukt vorgenommen. Durch Verwendung von Primern innerhalb der BS^(r) Kasette und abermals Primern 5' *upstream* des linken Arms bzw. 3' *downstream* des rechten Arms, wurden potentielle RdRP *knock out* Stämme in zwei weiteren PCR-Analysen verifiziert (verwendete Primer vgl. Tab. 13.4.). Zur Entfernung des BS^(r) Selektionsmarkers wurde der Cre Rekombinase exprimierende Vektor pDEX RH NLS-cre (Faix et al., 2004) in den jeweiligen RdRP *knock out* Stamm transformiert. Zur Gewährleistung einer transienten Expression und Vermeidung einer dauerhaften Integration des Vektors ins Genom erfolgte die Selektion mit G10 Medium für 3 – 5 Tage. Nach erneuter Erzeugung von Einzelklonen wurden diese durch Kultur in Blasticidin bzw. Genitacin enthaltendem Selektionsmedium zunächst phänotypisch analysiert. Blasticidin und Genitacin sensitive Klone wurden dann unter Verwendung der in Tabelle 13.4. angegebenen Primer durch PCR-Analysen verifiziert.

Tab. 9.3.: Vorhandene und neu hergestellte RdRP *knock out* Stämme.

	<i>knock out</i> Stamm	BS ^(r)	verwendete <i>knock out</i> Vektoren	Urheber
RdRP single <i>knock out</i> Stämme	<i>rrpA</i> ^{—H.M.}	+	<i>rrpA</i> KO BS ^(r)	Martens et al., 2002
	<i>rrpA</i> ^{—lox}	+	pLPBLP <i>rrpA</i> KO cre-lox BS ^(r)	S. Kasten (unveröff.)
	<i>rrpA</i> ^{—rox}	—		
	<i>rrpB</i> ^{—lox}	+	pLPBLP <i>rrpB</i> KO cre-lox BS ^(r)	S. Wiegand (unveröff.) S. Fuhrmann (unveröff.)
	<i>rrpB</i> ^{—rox}	—		
	<i>rrpC</i> ^{—lox}	+	pLPBLP <i>rrpC</i> KO cre-lox BS ^(r)	S. Wiegand (unveröff.) S. Kasten (unveröff.)
	<i>rrpC</i> ^{—rox}	—		
RdRP double knock out Stämme	<i>rrpA</i> ^{—rox} <i>rrpB</i> ^{—lox}	+	pLPBLP <i>rrpA</i> KO cre-lox BS ^(r)	S. Fuhrmann (unveröff.)
	<i>rrpA</i> ^{—rox} <i>rrpB</i> ^{—rox}	—	pLPBLP <i>rrpB</i> KO cre-lox BS ^(r)	
	<i>rrpA</i> ^{—rox} <i>rrpC</i> ^{—lox}	+	pLPBLP <i>rrpA</i> KO cre-lox BS ^(r)	S. Wiegand (unveröff.)
	<i>rrpA</i> ^{—rox} <i>rrpC</i> ^{—rox}	—	pLPBLP <i>rrpC</i> KO cre-lox BS ^(r)	
	<i>rrpB</i> ^{—rox} <i>rrpC</i> ^{—lox}	+	pLPBLP <i>rrpB</i> KO cre-lox BS ^(r)	S. Wiegand (unveröff.)
	<i>rrpB</i> ^{—rox} <i>rrpC</i> ^{—rox}	—	pLPBLP <i>rrpC</i> KO cre-lox BS ^(r)	
RdRP triple <i>knock out</i> Stämme	<i>rrpA</i> ^{—rox} <i>rrpB</i> ^{—rox} <i>rrpC</i> ^{—lox}	+	pLPBLP <i>rrpA</i> KO cre-lox BS ^(r)	S. Fuhrmann (unveröff.)
	<i>rrpA</i> ^{—rox} <i>rrpB</i> ^{—rox} <i>rrpC</i> ^{—rox}	—	pLPBLP <i>rrpB</i> KO cre-lox BS ^(r) pLPBLP <i>rrpC</i> KO cre-lox BS ^(r)	S. Wiegand (unveröff.)

Abschließend wurden alle vorhandenen und neu hergestellten RdRP *knock out* Stämme in Southern Blot Analysen unter Verwendung der in Tabelle 8.18. angegebenen Sonden verifiziert (Abb. 9.5. und 9.6.). Die hierbei verwendeten Restriktionsenzymen und erwarteten Signale für die jeweiligen *knock out* Stämme sind in Tabelle 9.4. aufgeführt.

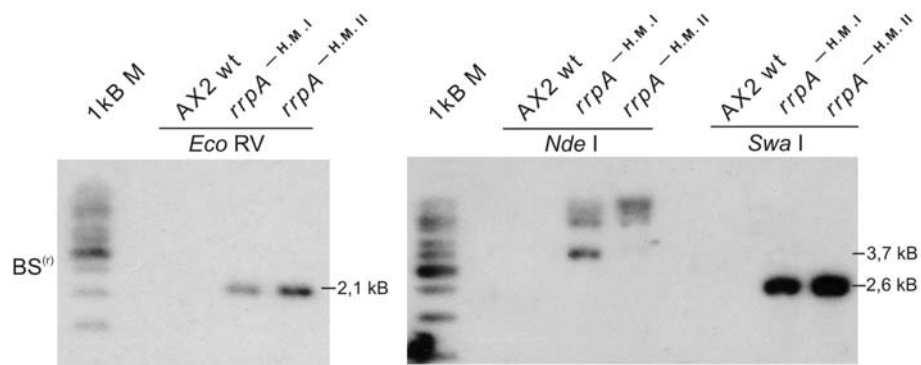


Abb. 9.5.: Southern Blot Analyse des RdRP *knock out* Stamms *rrpA*^{-H.M.} Genomische DNA von AX2 wt und *rrpA*^{-H.M.} wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco* RV, *Nde* I und *Swa* I gespalten und nachfolgend in einer Southern Blot Analyse mit einer Sonde zum Nachweis des BS^(r) Selektionsmarkers hybridisiert. *rrpA*^{-H.M.}^I und *rrpA*^{-H.M.}^{II} bezeichnen hierbei unterschiedliche Sporenproben desselben *knock out* Stamms (H. M., Henrik Martens). Erwartete Fragmente für Verdau mit *Eco* RV 2082 bp, *Nde* I 3769 bp, *Swa* I 2630 bp sind zu erkennen. Zusätzliche Signale bei der *Nde* I Restriktionsspaltung entstehen vermutlich durch unvollständigen Verdau. 1kb M bezeichnet 1kb Marker (#SM0311 Fermentas).

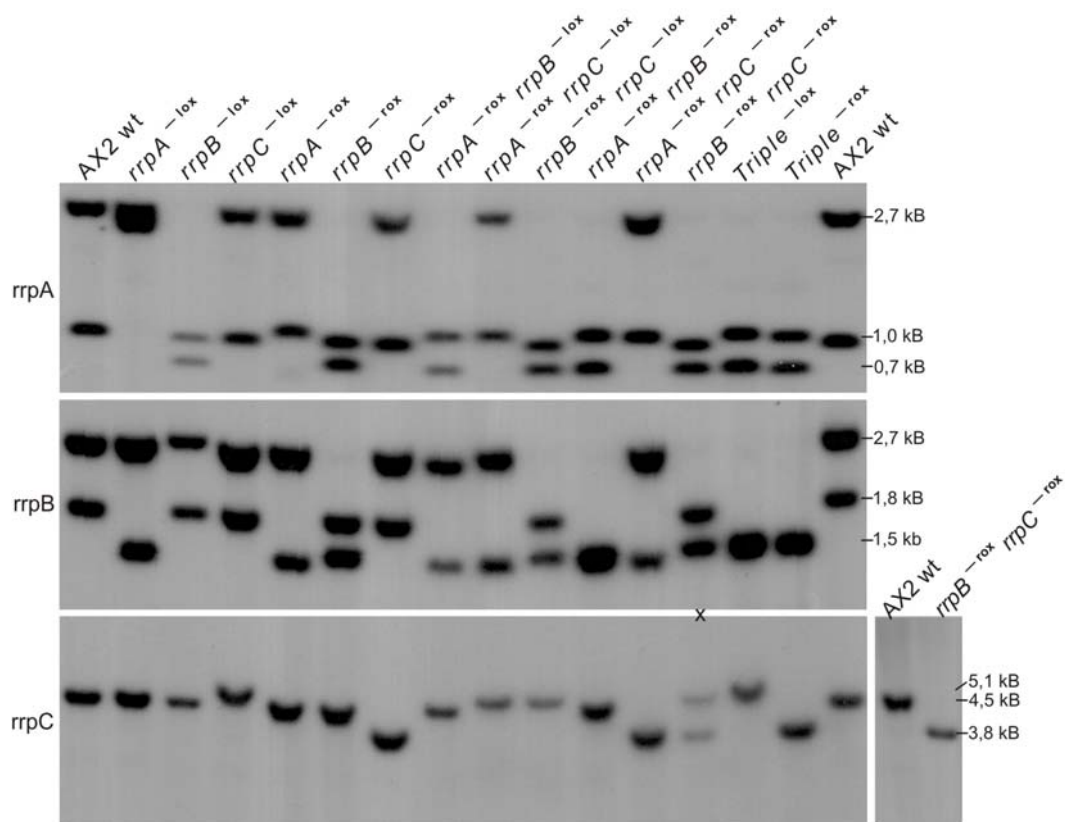


Abb. 9.6.: Southern Blot Analyse von RdRP *knock out* Stämmen. Genomische DNA von AX2 wt, RdRP *single*, *double* und *triple knock out* Stämmen wurden mit den in Tabelle 9.4. angegebenen Restriktionsenzymen gespalten und nachfolgend in einer Southern Analyse mit den OLB Sonden *rrpA*, *rrpB* und *rrpC* hybridisiert. Die erwarteten Signale wurden in Tabelle 9.4. aufgeführt. x markiert eine vermischte Probe ohne Relevanz.

Tab. 9.4.: Erwartete Signale für RdRP *knock out* Stämme in Southern Blot Analysen.

OLB Sonde		<i>rrpA</i>		<i>rrpB</i>		<i>rrpC</i>
Restriktionsspaltung		<i>Sty</i> I / <i>Cla</i> I		<i>Sty</i> I / <i>Cla</i> I		<i>Sty</i> I
erwartetes Signal	Stamm	<i>rrpA</i>	<i>rrpB</i>	<i>rrpA</i>	<i>rrpB</i>	<i>rrpC</i>
	wt	942 bp	2779 bp	1840 bp	2779 bp	4560 bp
	-lox	2407 bp	768 bp	1471 bp	2917 bp	5185 bp
	-rox	1007 bp	768 bp	1471 bp	1516 bp	3785 bp

Sowohl die durchgeführten PCR-Analysen als auch die in Abbildung 9.5. und 9.6. aufgeführten Southern Blot Analysen, verifizieren die hergestellten RdRP *knock out* Stämme. In einem Kooperationsprojekt mit L. Avesson (Dep. of Molecular Biology, SLU, Uppsala) konnten jedoch in zusätzlichen RT-PCR Analysen dieser Stämme Transkripte am 3' Ende der kodierenden Sequenz der RdRPs nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden in Northern Blot Analysen signifikante Mengenunterschiede von Skipper und DIRS siRNAs in *knock out* Stämmen von *rrpC* mit und ohne BS^(r) Selektionsmarker festgestellt (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden RdRP Deletionsstämme generiert, in denen die Helicase und RdRP Domäne vollständig deletiert wurden (vgl. Abschnitt 9.4.).

9.3.2. Discoidin Reportersystem in RdRP *knock out* Stämmen

Zur Analyse des RNAi Mechanismus in *D. discoideum* wurde zunächst das 2002 von H. Martens entwickelte Discoidin Reportersystem eingesetzt. Hierbei kann durch Expression eines *hairpin* RNA Konstrukts die Expression des Endogens *discoidin* reduziert oder vollständig unterbunden werden, was als partielles bzw. vollständiges *Silencing* bezeichnet wird (Martens et al., 2002).

Zur Analyse wurden die bereits vorhandenen discoidin *hairpin* RNA (Martens et al., 2002) bzw. *antisense* RNA (Popova et al., 2006) exprimierenden Vektoren (pDneo2 disc hp; pDneo2 disc as; vgl. Abschnitt 13.1.4.) verwendet. Diese Vektoren konnten durch Elektroporation in den jeweiligen RdRP *knock out* Stamm transformiert werden. Durch Subklonierung generierte Einzelklone, wurden zunächst in Costar-Platten und nachfolgend in Petrischalen angezogen. Zur Analyse konnten anschließend alle Einzelklone in Schüttelkultur überführt werden. Da die Expression von *discoidin* in *D. discoideum* abhängig von der Zelldichte der Kultur ist (Wetterauer et al., 1995), wurden nur exponentiell wachsende Kulturen untersucht. Hierzu wurden von allen Einzelklonen Proben für Western Blot Analysen entnommen und für ausgewählte Einzelklone Gesamt-RNA für Northern Blot Analysen aufgereinigt. In Abbildung 9.7. ist ein Beispiel der durchgeführten Western Blots dargestellt. Zur semiquantitativen Auswertung konnten Transfereffizienz und der Nachweis gleicher Lademengen durch Detektion von Coronin und Coomassie Färbung des SDS-PAA-Gels herangezogen werden. Die durchgeführten Einzelklonanalysen ermöglichen die Bestimmung der individuellen Stärke des *Silencings* in den untersuchten Klonen durch Vergleich der Signalstärken zu AX2 Wildtyp und dem jeweiligen RdRP *knock out* Stamm. Hierbei traten hohe Varianzen zwischen den Klonen auf. In Abbildung 9.7. zeigen z.B. die analysierten Klone 1 – 7 des *rrpA*^{– rox} Stamms eine typisch auftretende Varianz von

annähernd 0% bis 100% *Silencing*. Um die Ergebnisse übersichtlich darstellen und besser untereinander vergleichen zu können, wurden die untersuchten Klone entsprechend der noch vorhandenen Discoidin Expression in vier Gruppen unterteilt. Alle mit den pDneo2 disc hp und pDneo2 disc as Vektoren durchgeführten Einzelklonanalysen in den jeweiligen RdRP *knock out* Stämmen sind in Tabelle 9.5. und 9.6. zusammengefasst.

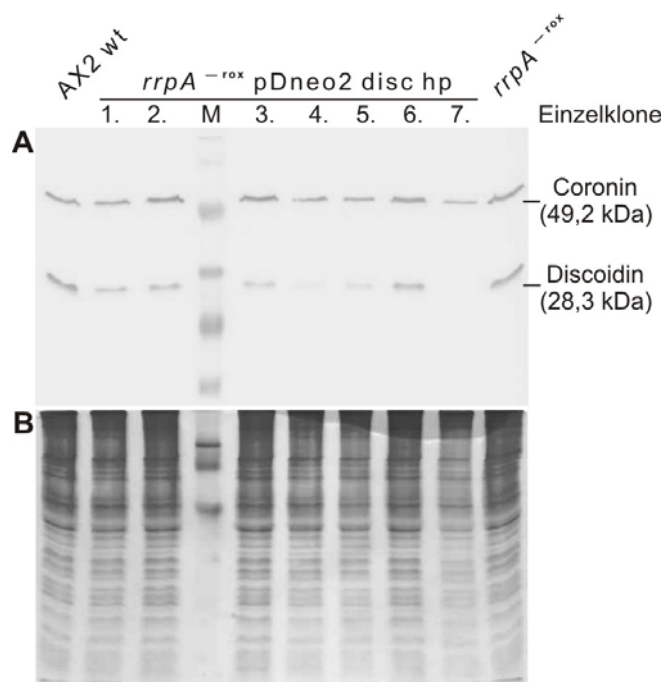


Abb. 9.7.: Beispiel eines Western Blots zur Analyse des Discoidin Reportersystems.

A.: Auftrennung von Gesamtprotein aus 4×10^5 Zellen (Einzelklone) in einer 12% SDS PAGE. Nach Transfer mittels Elektro-Blot im *semi-dry* Verfahren erfolgte der immunologische Nachweis von Discoidin und Coronin als Transferkontrolle. Durch Vergleich der erhaltenen Signalstärken zu AX2 wt und dem jeweiligen RdRP *knock out* Stamm erfolgte die semiquantitative Auswertung. M bezeichnet verwendeten Größenstandard (#SM0441 Fermentas).

B.: Überprüfung gleicher Lademengen nach Transfer durch Coomassie Färbung des SDS-PAA-Gels.

Tab. 9.5.: Western Blot Analyse nach Transformation von pDneo2 disc hp in RdRP *knock out* Stämme.

RdRP <i>knock out</i> Stamm + pDneo2 disc hp	Discoidin Expression (Anzahl Einzelklone)				Σ untersuchter Einzelklone
	100 – 75%	75 – 50%	50 – 25%	25 – 0%	
AX2 wt ^a	7	8	12	21	48
<i>rrpA</i> ^{–rox}	3	8	6	7	24
<i>rrpB</i> ^{–rox}	7	6	5	6	24
<i>rrpC</i> ^{–rox}	4	5	10	5	24
<i>rrpA</i> ^{–rox} <i>rrpB</i> ^{–lox}	0	0	0	21	21
<i>rrpA</i> ^{–rox} <i>rrpC</i> ^{–lox}	3	10	5	3	21
<i>rrpB</i> ^{–rox} <i>rrpC</i> ^{–lox}	2	10	9	0	21
<i>rrpA</i> ^{–rox} <i>rrpB</i> ^{–lox} <i>rrpC</i> ^{–lox a}	11	15	14	5	45

^a Ergebnis von zwei unabhängigen Transformationen.

Tab. 9.6.: Western Blot Analyse nach Transformation von pDneo2 disc as in RdRP *knock out* Stämme.

RdRP <i>knock out</i> Stamm + pDneo2 disc as	Discoidin Expression (Einzelklonanalyse)				Σ untersuchter Einzelklone
	100 – 75%	75 – 50%	50 – 25%	25 – 0%	
AX2 wt	3	4	6	1	14
<i>rrpA</i> ^{–lox}	2	4	5	3	14
<i>rrpB</i> ^{–lox}	0	0	0	14	14
<i>rrpC</i> ^{–lox}	2	1	5	6	14
<i>rrpA</i> ^{–lox} <i>rrpB</i> ^{–lox}	0	4	2	8	14
<i>rrpA</i> ^{–lox} <i>rrpC</i> ^{–lox}	3	5	3	3	14
<i>rrpB</i> ^{–lox} <i>rrpC</i> ^{–lox}	1	7	4	2	14
<i>rrpA</i> ^{–lox} <i>rrpB</i> ^{–lox} <i>rrpC</i> ^{–lox}	2	3	9	0	14

Die für die jeweiligen RdRP *knock out* Stämme ermittelten Werte zeigen sowohl für das verwendete Discoidin *hairpin* als auch für das *antisense* Konstrukt sehr unterschiedliche Verteilungsmuster, welche nicht interpretierbar sind. Auch in den für ausgewählte Klone mit vollständigem *Silencing* durchgeführten Northern Blots zum Nachweis von *discodin* mRNA und von discodin siRNAs, welche aus der Prozessierung des *hairpins* stammen, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Daher wurde abschließend in allen untransformierten RdRP *knock out* Stämmen vergleichend die Expression von Discoidin bestimmt. Hierfür wurden nur exponentiell wachsende Kulturen, welche neu aus Sporen angezüchtet wurden, eingesetzt. Die in Abbildung 9.8. dargestellten Western Blots zeigen gravierende Expressionsunterschiede zwischen den untersuchten RdRP *knockt out* Stämmen. Vor allem in den Stämmen $rrpA^{-lox}$ und $rrpA^{-rox} rrpB^{-lox}$ ist die Discoidin Expression deutlich reduziert, was eine Analyse der RNA-vermittelten Genregulation mit Hilfe des Discoidin Reportersystems ausschließt. Da unter den gewählten Bedingungen mit Hilfe des Discoidin Reportersystems keine reproduzierbare Analyse des RNAi Mechanismus in RdRP *knock out* Stämmen erfolgen konnte, wurden zwei alternative Reportersysteme entwickelt, eines gegen das endogene *cadA* und eines gegen das transgene *lacZ* (vgl. Abschnitt 9.6.; 9.7.).

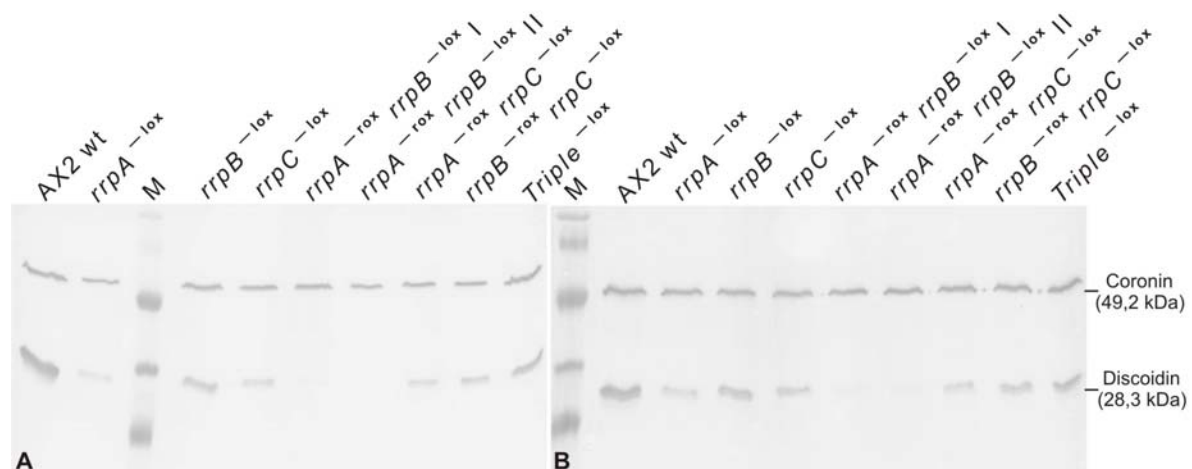


Abb. 9.8.: Western Blot zum Nachweis von Discoidin in RdRP *knock out* Stämmen. Für die Western Analyse wurden exponentiell wachsende Kulturen, welche neu aus Sporen angezüchtet wurden, eingesetzt. $rrpA^{-rox} rrpB^{-lox I}$ und $rrpA^{-rox} rrpB^{-lox II}$ bezeichnen hierbei unterschiedliche Sporenproben desselben *knock out* Stamms. M bezeichnet den verwendeten Größenstandard (#SM0441 Fermentas). Die Durchführung des Western Blots erfolgte wie in Abbildung 9.7. beschrieben. A und B zeigen zwei biologische Replikate.

9.4. RdRP Deletionsstämme

RdRP Deletionsstämme (symbolisiert in den Abbildungen durch „Δ“) bezeichnen Stämme mit einer vollständigen Deletion von Helicase und RdRP Domäne und der dazwischen liegenden genomischen Sequenz. Auch hier werden Stämme, welche den BS^(r) Selektionsmarker beinhalten mit „lox“ und Stämme ohne Selektionsmarker mit „rox“ bezeichnet.

9.4.1. Prinzip der Herstellung von Gendeletionsvektoren mittels pKOSG System

Die konventionelle Strategie zur Erstellung eines Gendeletionsvektors für *D. discoideum* beinhaltet eine Reihe aufeinanderfolgender Klonierungsschritte. Diese sind notwendig, da im Gegensatz zu anderen Modellorganismen wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, wo bereits 20 Nukleotide als Bereich für homologe Rekombination ausreichen (Baudin et al., 1993), in *D. discoideum* Bereiche von einigen hundert Nukleotiden benötigt werden. Daher werden zur Herstellung eines Gendeletionsvektors für *D. discoideum* die für die homologe Rekombination notwendigen Bereiche des auszuschaltenden Gens (rechter und linker Arm) mittels PCR amplifiziert und zur Sequenzierung zunächst in einen Klonierungsvektor kloniert. Nachfolgend können aus diesen dann nacheinander linker und rechter Arm in gerichteten Ligationen in den pLPBLP Vektor (Faix et al., 2004) kloniert werden. Diese Strategie beinhaltet die Kontrolle zahlreicher Klone aus den einzelnen Schritten und ist zudem abhängig vom Vorhandensein geeigneter kompatibler Restriktionsschnittstellen.

Um Zeit- und Materialaufwand für die Herstellung von Gendeletionsvektoren zu reduzieren, wurde das pKOSG System entwickelt (vgl. Abb. 9.9.bzw. Wiegand et al., 2011). Basierend auf dem StarGate[®]-*combinatorial cloning* System und dem pLPBLP Vektor wurde hierfür in Kooperation mit der Firma IBA (Göttingen) das Akzeptor System pKOSG IBA-Dictyl1 entwickelt. Dieses ermöglicht durch *combinatorial cloning* in einer Einschritt-Reaktion die Herstellung eines fertigen Gendeletionsvektors. Hierbei werden rechter und linker Arm mit angehängten *StarCombinase* Bindestellen und *combinatorial sites* C1 – C4, welche in Tabelle 9.7. aufgeführt wurden, mittels PCR amplifiziert. Zusätzlich wird in den *forward* Primer des linken Arms und den *reverse* Primer des rechten Arms die selbe Restriktionsschnittstelle (RS) integriert (vgl. Abb. 9.9. B). Dies erlaubt es, das für die Transformation in *D. discoideum* benötigte lineare *knock out* Konstrukt, das aus einem durch linken bzw. rechten Arm flankierten Selektionsmarker besteht, aus dem Gendeletionsvektor herauspalten zu können. Die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym sollte nicht in der Sequenz der Arme oder im Selektionsmarker enthalten sein. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte können beide Arme

in einer Einschnitt-Reaktion durch *combinatorial cloning* in das Akzeptor System pKOSG IBA-Dicty1 integriert werden. Hierbei interagieren die verwendeten *StarCombinasen* mit den *StarCombinase* Bindestellen im Akzeptor System und in den zugefügten PCR-Produkten. Spaltung und Ligation im Bereich der *combinatorial sites* durch *StarCombinasen* führen zur gerichteten Verbindung von rechtem und linkem Arm mit dem Selektionsmarker und dem Vektorrückgrat (vgl. Abb. 9.9. C - E). Da das verwendete StarGate®-*combinatorial cloning* patentrechtlich geschützt ist, sind keine Angaben zur genauen Funktionsweise dieser Reaktion verfügbar. Anhand der Herstellung von RdRP Deletionsstämmen erfolgte die Validierung dieses Systems (vgl. Abschnitt 9.4.2.).

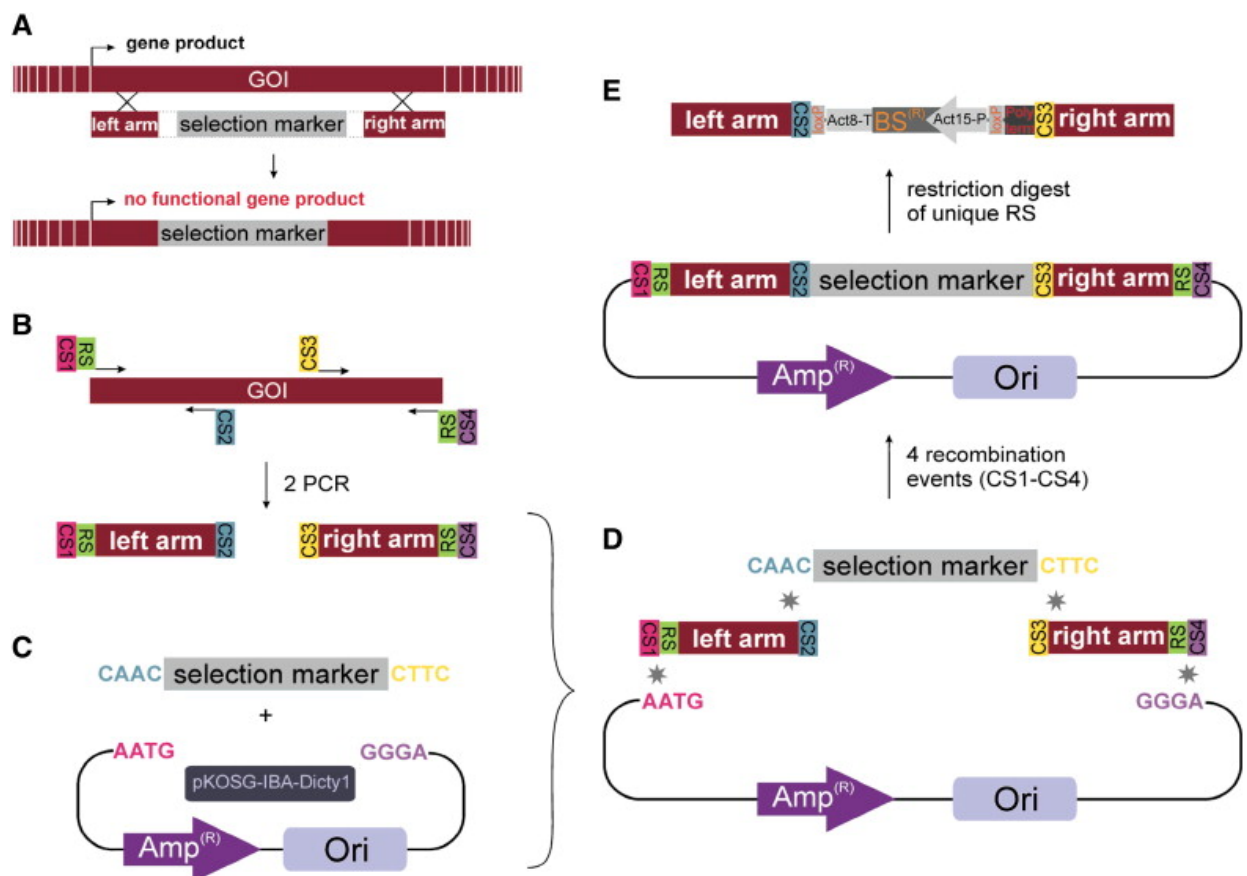


Abb. 9.9.: Herstellung von Gendeletionsvektoren mittels pKOSG System. **A:** Darstellung eines knock out Konstrukts für *D. discoideum*, bestehend aus zwei Fragmenten oder flankierenden genomischen Bereichen des auszuschaltenden Gens (linker bzw. rechter Arm), welche einen Selektionsmarker flankieren. Zwei Rekombinationsereignisse zwischen knock out Konstrukt und Zielgen führen zur Integration des Selektionsmarkers in das auszuschaltende Gen, wobei der endogene Bereich zwischen linkem und rechtem Arm deletiert wird. **B – E:** Herstellung von Gendeletionsvektoren mittels pKOSG System. **B:** PCR zur Amplifikation von linkem und rechtem Arm mit genspezifischen Primern mit angehängten *StarCombinase* Bindestellen, *combinatorial sites* C1 – C4 und Restriktionsschnittstellen (RS). Details siehe Tab. 9.7. **C:** Akzeptor System pKOSG IBA-Dicty1 bestehend aus Selektionsmarker, welcher durch *StarCombinase* Bindestellen und die *combinatorial sites* CAAC bzw. CTTC flankiert wird. Das Vektorrückgrat, welches das Resistenzgen ($Amp^{(R)}$) und den *origin of replication* (ORI) beinhaltet, wird ebenfalls durch *StarCombinase* Bindestellen und den *combinatorial sites* AATG bzw. GGGA flankiert. *StarCombinase* Bindestellen sind nicht dargestellt. **D:** Einschnitt-Reaktion, in der durch *StarCombinasen* (Sterne) Selektionsmarker, Vektorrückgrat, linker und rechter Arm gerichtet miteinander verbunden werden, woraus ein Gendeletionsvektor resultiert. **E:** Zur Analyse des Gendeletionsvektors kann die Restriktionsschnittstelle (RS), welche das knock out Konstrukt flankiert, verwendet werden. Die gleiche Restriktionsspaltung wird auch zur Herstellung eines linearen knock out Konstrukts zur Transformation in *D. discoideum* eingesetzt (Abbildung aus Wiegand et al., 2011).

Tab. 9.7.: Primerdesign für das pKOSG System (nach Wiegand et al., 2011).

Primer	combinatorial site	Primersequenz (5'→3') ^a
LA 1	CS 1	AGCGCGTCTCCAATG – RS – forward Sequenz linker Arm
LA 2	CS 2	AGCGCGTCTCCGTTG – reverse Sequenz linker Arm
RA 1	CS 3	AGCGCGTCTCCCTTC – forward Sequenz rechter Arm
RA 2	CS 4	AGCGCGTCTCCTCCC – RS – reverse Sequenz rechter Arm

^a StarCombinase Bindestellen sind in hellblau dargestellt. Gleiche Restriktionsschnittstelle in LA1 und RA2 ist grün markiert. Farbwahl analog zu Abbildung 9.9.

9.4.2. Validierung des pKOSG Systems

Zur Herstellung von RdRP Stämmen mit vollständiger Deletion von Helicase und RdRP Domäne wurden die in Tabelle 9.8. aufgeführten Gendeletionsvektoren generiert. Zur Validierung des pKOSG Systems wurde eine Serie von Deletionsvektoren mit dem pKOSG System generiert. Zum Vergleich diente eine Serie von konventionell klonierten pLPBLP Vektoren mit identischen Positionen des linken und rechten Arms. Vektorkarten und Details zur Klonierungsstrategie dieser Vektoren sind in Abschnitt 13.1.5. aufgeführt. Bei allen RdRP KO Del Vektoren sind jeweils die linken Arme 5' *upstream* der Helicase Domäne und die rechten Arme 3' *downstream* der RdRP Domäne positioniert, woraus bei erfolgreichem *knock out* eine vollständige Deletion der Domänen und der dazwischen liegenden Sequenz resultiert. Da in späteren Versuchen mit den Vektoren rrpC KO Del I zunächst keine erfolgreiche Gendeletion von *rrpC* generiert werden konnte, wurden die Vektoren rrpC KO Del II mit veränderter Position von rechtem und linkem Arm erstellt, sowie der Vektor rrpC KODO zur ausschließlichen Deletion der RdRP Domäne. Da jedoch nach erneuter Transformation des Vektors pKOSG rrpC KO Del I ein *rrpC* Deletionsstamm generiert werden konnte, wurden die zusätzlich erstellten Vektoren nicht mehr benötigt. Diese sind daher nur der Vollständigkeit halber in Tabelle 9.8. aufgeführt. Zur Etablierung des Systems, wurden zunächst RdRP Deletionsvektoren erstellt und jeweils zehn zufällig ausgewählte Klone durch analytische Restriktionsspaltung untersucht (vgl. Abb. 9.10.) Alle RdRP Deletionsvektoren konnten mit dem pKOSG System im ersten Ansatz generiert werden, wobei die Ausbeute positiver Klone zwischen 70% und 100% variierte (vgl. Tab. 9.8.).

Neben diesen wurden von anderen Mitarbeitern der AG weitere 13 Gendeletionsvektoren erstellt, mit Effizienzen zwischen 14% und 100%. Insgesamt konnten bei der Etablierung des pKOSG Systems 16 Vektoren im ersten Ansatz erfolgreich erstellt werden, wobei die Ausbeute positiver Klone für die Hälfte der Konstrukte über 90% lag (Wiegand et al., 2011). Für ausgewählte Klone wurde anschließend die korrekte Orientierung und Sequenz der Arme durch Sequenzierung bestätigt.

Tab. 9.8.: Neue Gendeletionsvektoren zur Herstellung von RdRP Deletionsstämmen.

Gen	Gendeletionsvektor ^a	Position linker Arm im Gen ^b	Position rechter Arm im Gen ^b	erzeugte Deletion	positive Klone ^c	Effizienz
<i>rrpA</i>	pLPBLP <i>rrpA</i> KO Del	+1306, +2057	+5219, +5990	3161 bp	— 7/10	— 70%
	pKOSG <i>rrpA</i> KO Del					
<i>rrpB</i>	pLPBLP <i>rrpB</i> KO Del	+1273, +2024	+5275, +6046	3250 bp	— 7/10	— 70%
	pKOSG <i>rrpB</i> KO Del					
<i>rrpC</i>	pLPBLP <i>rrpC</i> KO Del I	+670, +1323	+5190, +5960	3866 bp	— 10/10	— 100%
	pKOSG <i>rrpC</i> KO Del I					
	pLPBLP <i>rrpC</i> KO Del II	+107, +554	+6151, +6677	5596 bp	— 9/10	— 90%
	pKOSG <i>rrpC</i> KO Del II					
	pLPBLP KODO	+3135, +3630	+5190, +5960	1559 bp	— 10/10	— 100%
	pKOSG KODO					

^a Details zur verwendeten Klonierungsstrategie der Gendeletionsvektoren sind im Abschnitt 13.1.5. aufgeführt.

^b Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Start Codon im Gen.

^c Durch analytische Restriktionsspaltung verifizierte Klone (vgl. Abb. 9.10.).

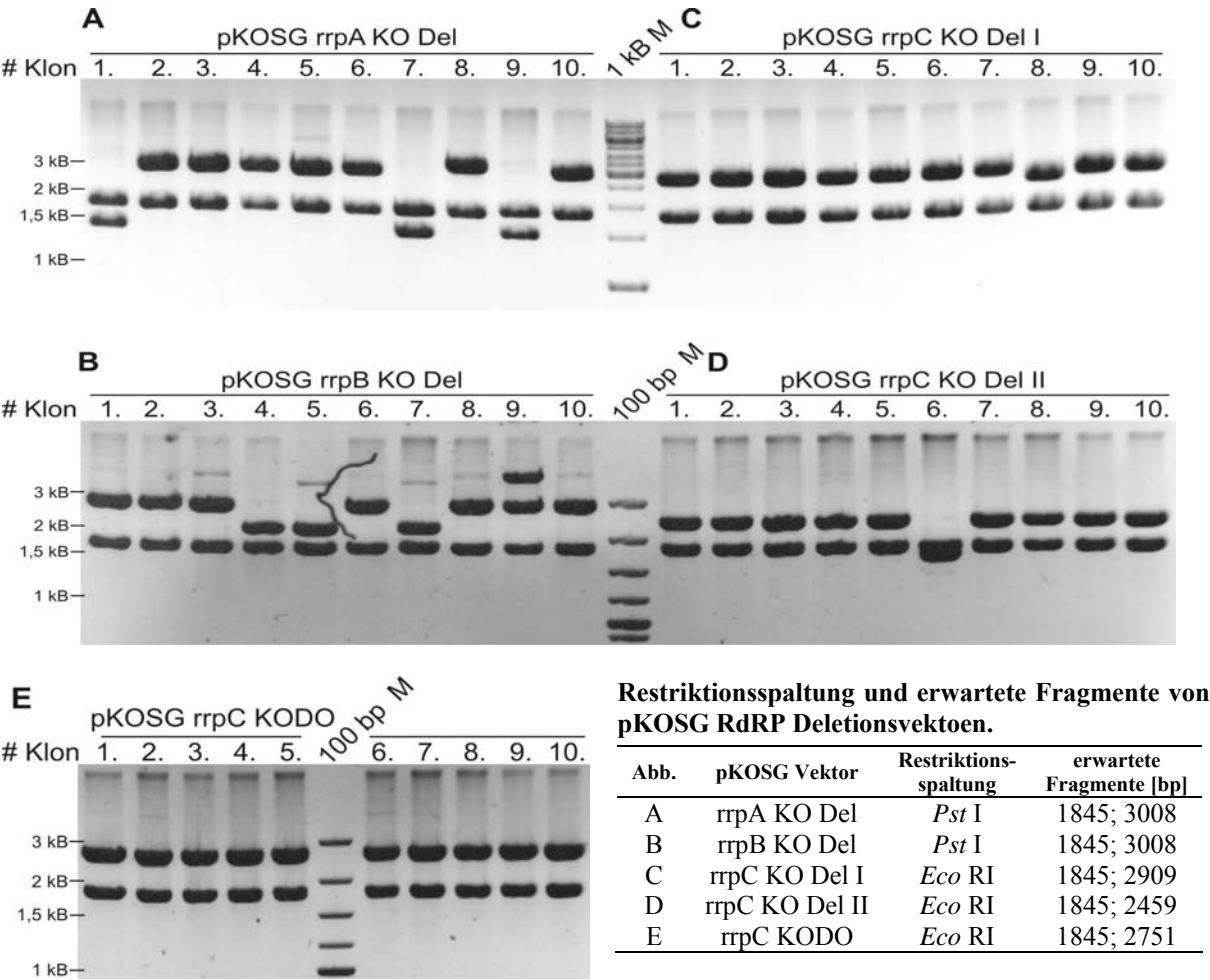


Abb. 13.1. Analytische Restriktionsspaltung von potentieller pKOSG RdRP Deletionsvektoren. Verwendete Restriktiosenzym und erwartete Fragmente wurden in der Tabelle aufgeführt. 100bp M bezeichnet verwendeten Größenstandard (100bp DNA Ladder Plus/#SM0321 Fermentas) (Abb. nach Wiegand et al., 2011).

Um die Funktionalität der so hergestellten Gendeletionsvektoren in *D. discoideum* verifizieren zu können, wurden in vergleichenden Studien konventionelle pLPBLP Vektoren und pKOSG Vektoren zur Deletion von *rrpA*, *rrpB* und *rrpC* eingesetzt. Nach Transformation und Erzeugung von Einzelklonen wurden diese in drei unabhängigen PCR-Analysen überprüft und so die *knock out* Effizienzen der unterschiedlichen Konstrukte bestimmt. Im ersten Schritt erfolgte der Nachweis der jeweiligen Wildtyp RdRP im Bereich der erzeugten Deletion. Klone, welche hierbei kein Signal zeigten, wurden durch Einsatz von Primern innerhalb der BS^(r) Kasette und 5' *upstream* des linken Arms bzw. 3' *downstream* des rechten Arms des jeweiligen Deletionskonstrukts in zwei weiteren PCR-Analysen untersucht (verwendete Primer vgl. Tab. 13.5.). Nur Klone, welche in diesen Reaktionen die erwarteten PCR-Signale zeigten, wurden als positiver Klon angesehen. Die in Tabelle 9.9. zusammengefasste Untersuchung ergab für *rrpA* und *rrpB* bei pLPBLP Vektoren etwas bessere *knock out* Effizienzen. Für *rrpC* konnte jedoch nur mit dem pKOSG Vektor ein *rrpC* Deletionsstamm generiert werden. Die erzeugten RdRP *single* Deletionsstämme wurden abschließend in Southern Blots verifiziert (vgl. Abb. 9.11.).

Tab. 9.9.: Vergleich der Effizienz der RdRP Deletionskonstrukte (nach Wiegand et al., 2011).

Gen	verwendeter Gendeletionsvektor	# Klone mit korrektem PCR-Signal ^a			Übersicht positive Klone ^b	<i>knock out</i> Effizienz
		Wildtyp	linker Arm	rechter Arm		
<i>rrpA</i>	pLPBLP <i>rrpA</i> KO Del ^c	36/36	36/36	33/36	33/36	92%
	pKOSG <i>rrpA</i> KO Del ^c	33/36	30/36	35/36	27/36	75%
<i>rrpB</i>	pLPBLP <i>rrpB</i> KO Del	14/18	14/18	10/18	9/18	50%
	pKOSG <i>rrpB</i> KO Del	4/18	5/18	4/18	4/18	22%
<i>rrpC</i>	pLPBLP <i>rrpC</i> KO Del I ^c	0/36	n.d. ^e	n.d. ^e	0/36	0%
	pKOSG <i>rrpC</i> KO Del I ^d	3/54	4/54	3/54	3/54	5,5%

^a Klone mit korrektem PCR-Signal, zeigten kein RdRP Wildtyp Signal im Bereich der erzeugten Deletion und die erwarteten Signale bei PCR-Analysen mit Primern innerhalb der BS^(r) Kasette und 5' *upstream* des linken Arms bzw. 3' *downstream* des rechten Arms (verwendete Primer vgl. Tab. 13.5.).

^b Nur Klone, welche jeweils in allen drei beschriebenen PCR-Analysen das erwartete Ergebnis zeigten, wurden als positiver Klon gewertet (Details siehe Text).

^c Ergebnis von jeweils zwei unabhängigen Transformationen, in denen jeweils 18 Klone analysiert wurden.

^d Ergebnis von jeweils drei unabhängigen Transformationen, in denen jeweils 18 Klone analysiert wurden.

^e n.d.: nicht durchgeführte PCR-Analyse.

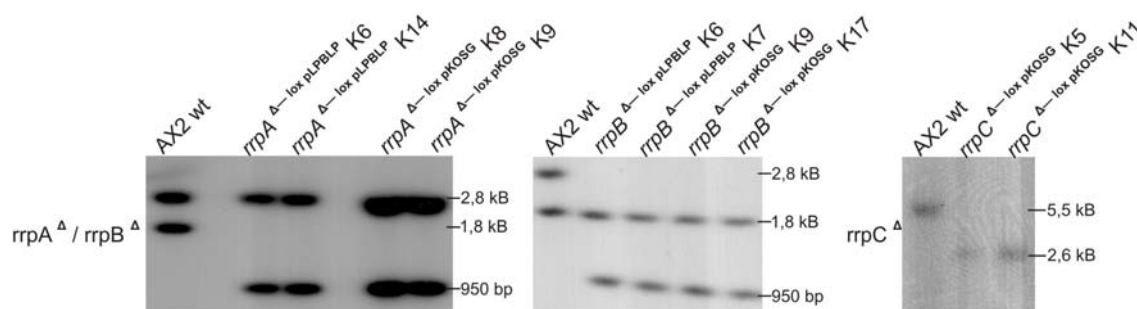


Abb. 9.11.: Southern Blot Analyse von RdRP *single* Deletionsstämmen. Genomische DNA von AX2 wt und RdRP *single* Deletionsstämmen wurden mit den in Tabelle 9.12. angegebenen Restriktionsenzymen gespalten und nachfolgend in einer Southern Analyse mit den OLB Sonden *rrpA*^Δ / *rrpB*^Δ bzw. *rrpC*^Δ hybridisiert. Die erwarteten Signale wurden ebenfalls in Tabelle 9.12. aufgeführt. K# bezeichnet zwei unabhängige Klone und pLPBLP bzw. pKOSG, die zur Generierung des Deletionskonstrukts verwendete Methode.

In den Analysen von jeweils zwei Klonen für die erzeugten Deletionsstämme, welche mit pLPBLP bzw. pKOSG Vektoren erzeugt wurden, konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Nach erfolgreicher Herstellung von RdRP *single* Deletionsstämmen sollte ferner überprüft werden, ob beim Entfernen des BS^(r) Selektionsmarkers durch transiente Expression der Cre Rekombinase Unterschiede zwischen Stämmen auftreten, die mit pKOSG bzw. pLPBLP Vektoren erstellt wurden. Hierfür wurde in vergleichenden Studien der BS^(r) Selektionsmarker aus den entsprechenden RdRP *single* Deletionsstämmen entfernt. Die durchgeführten Einzelklonanalysen zeigten, dass eine Entfernung des BS^(r) Selektionsmarkers in allen drei Deletionsstämmen, welche über pKOSG Vektoren erstellt wurden, möglich war (vgl. Tab. 9.10.). Dabei wurden keine signifikanten Effizienzunterschiede zu Stämmen, welche mittels pLPBLP Vektoren generiert wurden, beobachtet.

Tab. 9.10.: Effizienz der Entfernung des BS^(r) Selektionsmarkers aus RdRP *single* Deletionsstämmen.

Gen	verwendeter Gendeletionsvektor	phänotypische Analyse ^a		# Klone mit korrektem PCR-Signal ^b	Übersicht positive Klone ^c	Effizienz (Entfernung BS ^(r))
		Blasticidin sensitive Klone	Geneticin sensitive Klone			
<i>rrpA</i>	pLPBLP <i>rrpA</i> KO Del ^d	4/30	27/30	4/30	3/30	10%
	pKOSG <i>rrpA</i> KO Del ^d	6/30	29/30	6/30	6/30	20%
<i>rrpB</i>	pLPBLP <i>rrpB</i> KO Del ^d	15/36	35/36	8/36	8/36	22%
	pKOSG <i>rrpB</i> KO Del ^d	20/36	31/36	14/36	14/36	39%
<i>rrpC</i>	pKOSG <i>rrpC</i> KO Del I	5/18	18/18	5/18	5/18	28%

^a Bei Blasticidin resistenten Klonen wurde davon ausgegangen, dass keine erfolgreiche Entfernung des BS^(r) Selektionsmarkers vorlag. Bei Geneticin resistenten Klonen wurde angenommen, dass eine Integration des Cre Rekombinase exprimierenden Plasmids in das Genom vorlag.

^b PCR Analyse zum Nachweis der korrekten Entfernung der BS^(r) Kassette (verwendete Primer vgl. Tab. 13.5.).

^c Nur Klone, welche phänotypisch Blasticidin und Geneticin sensitiv waren und zusätzlich in der PCR Analyse ein Signal der erwarteten Größe aufwiesen, wurden abschließend als positiver Klon gewertet.

^d Ergebnis von jeweils zwei unabhängigen Transformationen des Cre Rekombinase exprimierenden Plasmids in zwei verschiedene Klonen von RdRP *single* Deletionsstämmen, mit jeweils 15 bzw. 18 analysierten Klonen.

9.4.3. Multiple RdRP Deletionsstämme

Da keine funktionellen Unterschiede zu konventionell hergestellten Deletionsvektoren festgestellt wurden, konnte mit den pKOSG Vektoren nach Entfernung der BS^(r) Kasette in den RdRP *single* Deletionsstämmen RdRP *double* Deletionsstämme in allen möglichen Kombinationen erzeugt werden. Zur Herstellung dieser Stämme wurden zunächst *rrpB* im Stamm *rrpA*^{Δ-rox} und *rrpC* in den Stämmen *rrpA*^{Δ-rox} und *rrpB*^{Δ-rox} deletiert. Nach Überprüfung der resultierenden RdRP *double* Deletionsstämme und erneuter Entfernung des BS^(r) Selektionsmarkers, wurde ein RdRP *triple* Deletionsstamm hergestellt, indem *rrpC* im Stamm *rrpA*^{Δ-rox} *rrpB*^{Δ-rox} deletiert wurde.

Die Kontrolle dieser Stämme durch PCR-Analysen und die jeweils nachfolgende Entfernung des BS^(r) Selektionsmarkers durch transiente Expression der Cre Rekombinase erfolgte analog zur Herstellung der *single* Deletionsstämmen (vgl. Abschnitt 9.4.2.). Tabelle 9.11. fasst die hergestellten Stämme mit den jeweils bestimmten Effizienzen für die Erstellung des Deletionsstamms und die nachfolgende Entfernung des BS^(r) Selektionsmarkers zusammen.

Tab. 9.11.: Übersicht über hergestellte RdRP Deletionsstämme.

	Deletionsstamm ^a	BS ^(r)	verwendeter Gen-deletionsvektor	positive Klone	Effizienz
RdRP <i>single</i> Deletionsstämme	<i>rrpA</i> ^{Δ-lox} K8, 9	+		27/36 ^b	75%
	<i>rrpA</i> ^{Δ-rox} K5	–	pKOSG <i>rrpA</i> KO Del	3/30 ^c	10%
	<i>rrpB</i> ^{Δ-lox} K9, 17	+		4/18 ^b	22%
	<i>rrpB</i> ^{Δ-rox} K2	–	pKOSG <i>rrpB</i> KO Del	14/36 ^c	39%
	<i>rrpC</i> ^{Δ-lox} K5, 11	+		3/54 ^b	5,5%
	<i>rrpC</i> ^{Δ-rox} K1	–	pKOSG <i>rrpC</i> KO Del I	5/18 ^c	28%
RdRP <i>double</i> Deletionsstämme	<i>rrpA</i> ^{Δ-rox} <i>rrpB</i> ^{Δ-lox} K19, 24	+	pKOSG <i>rrpA</i> KO Del	9/16 ^b	56%
	<i>rrpA</i> ^{Δ-rox} <i>rrpB</i> ^{Δ-rox} K23	–	pKOSG <i>rrpB</i> KO Del	2/24 ^c	8%
	<i>rrpA</i> ^{Δ-rox} <i>rrpC</i> ^{Δ-lox} K4, 5	+	pKOSG <i>rrpA</i> KO Del	3/13 ^b	23%
	<i>rrpA</i> ^{Δ-rox} <i>rrpC</i> ^{Δ-rox} K24	–	pKOSG <i>rrpC</i> KO Del I	4/24 ^c	17%
	<i>rrpB</i> ^{Δ-rox} <i>rrpC</i> ^{Δ-lox} K3, 15	+	pKOSG <i>rrpB</i> KO Del	2/18 ^b	11%
	<i>rrpB</i> ^{Δ-rox} <i>rrpC</i> ^{Δ-rox} K9	–	pKOSG <i>rrpC</i> KO Del I	10/48 ^c	21%
RdRP <i>triple</i> Deletionsstämme	<i>rrpA</i> ^{Δ-rox} <i>rrpB</i> ^{Δ-rox} <i>rrpC</i> ^{Δ-lox} K28, 42	+	pKOSG <i>rrpA</i> KO Del	2/48 ^b	4%
	<i>rrpA</i> ^{Δ-rox} <i>rrpB</i> ^{Δ-rox} <i>rrpC</i> ^{Δ-rox} K5	–	pKOSG <i>rrpB</i> KO Del pKOSG <i>rrpC</i> KO Del I	2/48 ^c	4%

^a K# bezeichnet die jeweils durch Southern Analyse verifizierten Einzelklone der jeweiligen Deletionsstämme.

^b Positive Klone wurden analog zur in Tabelle 9.9. beschriebenen Auswertung ermittelt. Die verwendeten Primer wurden in Tabelle 13.5. aufgeführt.

^c Positive Klone nach Entfernung des BS^(r) Selektionsmarkers wurden analog zur in Tabelle 9.10. beschriebenen Auswertung ermittelt.

Abschließend wurden alle hergestellten RdRP Deletionsstämme in Southern Blot Analysen überprüft (vgl. Abb. 9.12.). Die verwendeten Restriktionsenzyme, eingesetzte Sonden und erwarteten Signale für die jeweiligen Deletionsstämme sind in Tabelle 9.4. zusammengefasst. Aufgrund der hohen Sequenzidentität musste bei Restriktionsspaltung mit *Sty* I / *Cla* I der spezifische Nachweis der Deletion von *rrpA* oder *rrpB* mit der Sonde *rrpA*^Δ / *rrpB*^Δ erfolgen und die erfolgreiche Entfernung des Selektionsmarkers in diesen Stämmen mit einer zweiten Sonde (*lox*^Δ / *rox*^Δ) nachgewiesen werden. Hierbei hybridisierte erstere mit dem rechten Arm und letztere mit dem linken Arm des eingesetzten Deletionskonstrukts von. Zum Nachweis der erfolgreichen Deletion von *rrpC* wurde nach Restriktionsspaltung mit *Eco* RV die Sonde *rrpC*^Δ eingesetzt, welche den Nachweis des rechten Arms des Deletionskonstrukts ermöglicht.

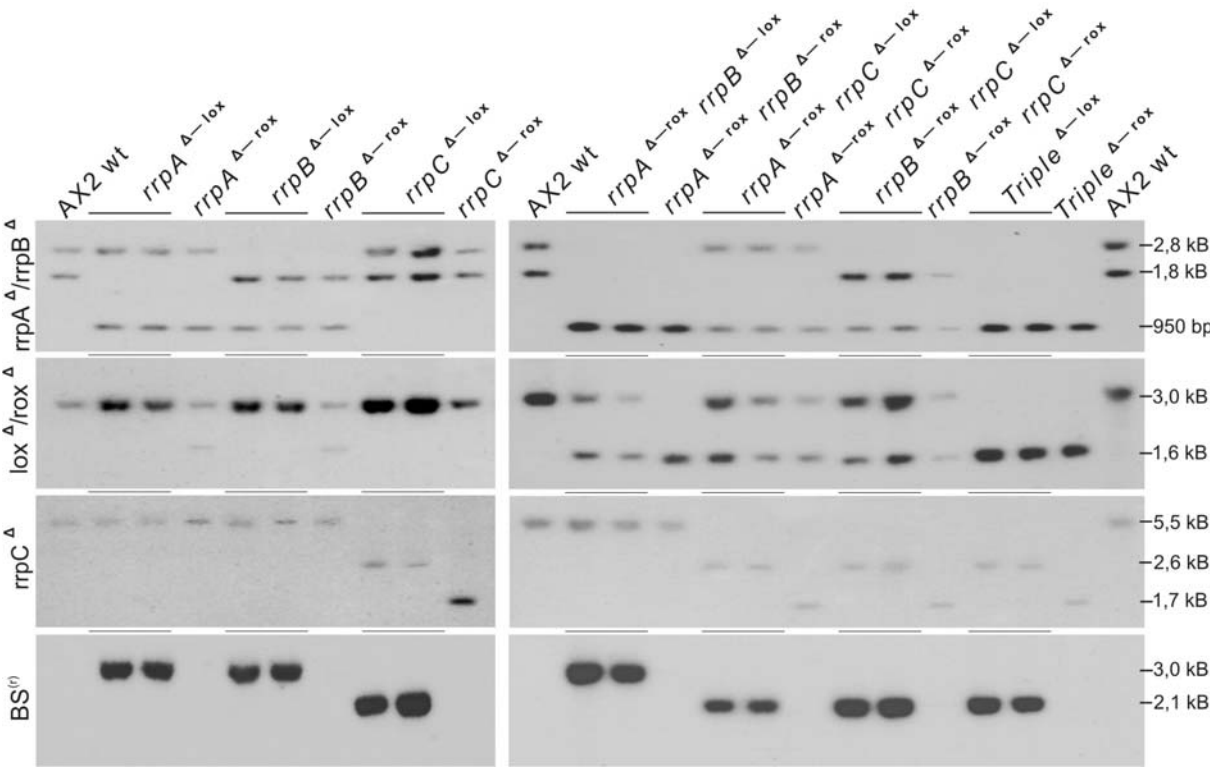


Abb. 9.12.: Southern Blot Analyse von RdRP Deletionsstämmen. Genomische DNA von AX2 wt, RdRP *single*, *double* und *triple* Deletionsstämmen wurde mit den in Tabelle 9.12. angegebenen Restriktionsenzymen gespalten und nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit den OLB Sonden *rrpA*^Δ/*rrpB*^Δ, *lox*^Δ/*rox*^Δ, *rrpC*^Δ und *BS*^(r) hybridisiert. Die erwarteten Signale sind in Tabelle. 9.12. aufgeführt. Linien markieren zwei analysierte Einzelklone der jeweiligen Deletionsstämme.

Tab. 9.12.: Erwartete Signale für Southern Blot Analyse von RdRP Deletionsstämmen.

Sonde		<i>rrpA</i> ^Δ / <i>rrpB</i> ^Δ		<i>lox</i> ^Δ / <i>rox</i> ^Δ		<i>rrpC</i> ^Δ	<i>BS</i> ^(r)		
Restriktionsspaltung		<i>Sty</i> I / <i>Cla</i> I		<i>Sty</i> I / <i>Cla</i> I		<i>Eco</i> RV	<i>Sty</i> I / <i>Cla</i> I		
erwartetes Signal	Stamm	<i>rrpA</i>	<i>rrpB</i>	<i>rrpA</i>	<i>rrpB</i>	<i>rrpC</i>	<i>rrpA</i>	<i>rrpB</i>	<i>rrpC</i>
	wt	1840bp	2779bp	2888bp	2941bp	5537bp	---	---	---
	Δ ^{-lox}	957bp	957bp	3030bp	2991bp	2664bp	3030bp	2991bp	2151bp
	Δ ^{-rox}	957bp	959bp	1630bp	1591bp	1749bp	---	---	---

Durch Hybridisierung mit der Sonde BS^(r) auf das Blastocidin-Resistenzgen, konnte nachgewiesen werden, dass nur eine Integration des jeweiligen Deletionskonstrukts an korrekter Position in das Genom erfolgt war und dass der Selektionsmarker in „rox“ Stämmen vollständig entfernt wurde. Abschließend wurde mittels PCR gezeigt, dass keine teilweise Integration des Cre Rekombinase exprimierenden Plasmids in „rox“ Stämmen aufgetreten war (vgl. Abb. 9.13.). Darüber hinaus konnte in Northern Blot Analysen zum Nachweis von Skipper und DIRS-1 siRNAs gezeigt werden, dass in den neu erstellten RdRP Deletionsstämmen keine signifikanten siRNA Mengenunterschiede in Deletionsstämmen der gleichen RdRP mit und ohne BS^(r) Selektionsmarker auftreten (vgl. Abb. 13.1. im Anhang). Daher wurden für alle im Folgenden aufgeführten Analysen die RdRP Deletionsstämmen ohne BS^(r) Selektionsmarker verwendet.

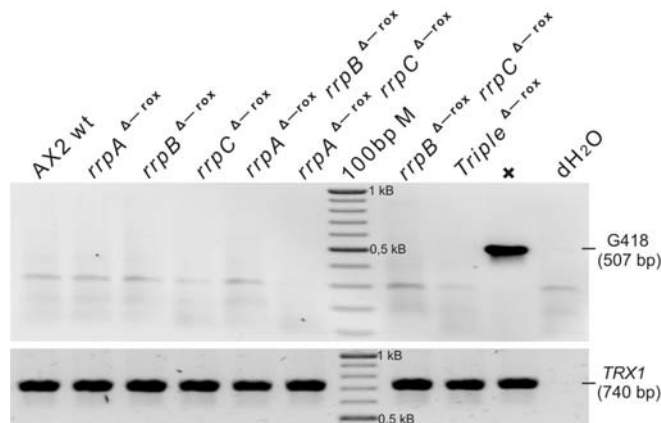


Abb. 9.13.: PCR zur Detektion des Genitocin-Resistenzgens in RdRP Deletionsstämmen. Die Amplifikation eines 507 bp großen Fragments des Genitocin-Resistenzgens (G418) von genomischer DNA der jeweiligen RdRP Deletionsstämmen erfolgte mit den Primern #1584 / #1585. Zur Qualitätskontrolle der verwendeten *Template* DNA erfolgte die Amplifikation eines 740 bp großen Fragments von *thioredoxin* (TRX1) mit den Primern #0122 / #0123. Als Positivkontrolle (+) wurde ein Stamm mit teilweiser Integration des Genitocin-Resistenzgens verwendet. dH₂O bezeichnet Negativkontrolle und 100bpM bezeichnet 100bp DNA Ladder Plus (#SM0321 Fermentas).

Bedingt durch die sehr hohe Sequenzidentität zwischen *rrpA* und *rrpB*, unterschieden sich die Gendeletionsvektoren beider Gene lediglich in 7 nt (= 0,9%) in der Sequenz des linken Arms und in 24 nt (= 3,1%) in der Sequenz des rechten Arms. Trotz dieser hohen Sequenzidentität konnten mit den jeweiligen Gendeletionsvektoren nur *rrpA* bzw. *rrpB* deletiert werden. Eine Deletion beider RdRPs mit nur einem Gendeletionsvektor konnte in keiner Transformation beobachtet werden.

Für alle RdRP Deletionsstämmen wurden Wachstumsanalysen durchgeführt. Hierbei zeigten nur *rrpC* Deletionsstämmen bei axenischem Wachstum im Vergleich zu AX2 Wildtyp gelegentlich längere Verdoppelungszeiten (ca. 2 - 4 Stunden). Da dieser Phänotyp jedoch zwischen verschiedenen *rrpC* Deletionsstämmen und in mehrfach durchgeführten biologischen Replikaten sehr stark schwankte und zum Teil nach längerer Kulturdauer nicht mehr nachweisbar war, konnte keine eindeutige und reproduzierbare Charakterisierung hierfür erfolgen. Während des Entwicklungszyklus von *D. discoideum* zu Sporen wurden bei keinem RdRP Deletionsstamm signifikante Unterschiede zum Wildtyp festgestellt. Gleiches gilt für das Schlüpfen der Sporen.

9.5. Veränderungen endogener RNAs in RdRP Deletionsstämmen

Ausgehend von bereits publizierten Studien, wonach TGS in die Stilllegung der Retrotransposons DIRS-1 und Skipper involviert sein könnte (Hinas et al., 2007; Kuhlmann et al., 2005), wurden längere Transkripte und siRNAs dieser Retroelemente in RdRP Deletionsstämmen analysiert. Zusätzlich erfolgte der quantitative Nachweis von zwei microRNAs. Hierbei wurden RdRP Deletionsstämmen und der *drnB* Deletionsstamm ohne BS^(r) Selektionsmarker untersucht. *drnB* kodiert für ein Dicer-ähnliches Protein. Dieser Deletionsstamm wurde von L. Avesson (Dep. of Molecular Biology, SLU, Uppsala) erstellt und freundlicherweise für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

9.5.1. Retrotransposon DIRS-1

Das Genom von *D. discoideum* enthält ca. 40 intakte Kopien und 200 – 300 Fragmente von DIRS-1 (*Dictyostelium intermediate repeat sequence*), welches damit das am häufigsten vorkommende LTR Retrotransposon ist (Eichinger et al., 2005). DIRS-1 lokalisiert größten Teils an einem Ende eines jeden Chromosoms, weshalb diese DIRS-1 *Cluster* als Zentromere in *D. discoideum* fungieren könnten (Glockner and Heidelberg, 2009). Ein weiteres Merkmal dieses Retrotransposons ist, dass springende DIRS-1 Elemente in DIRS-1 selbst oder Fragmente von diesem integrieren, jedoch ohne Präferenzen für bestimmte Positionen zu zeigen (Cappello et al., 1984). Abbildung 9.14. zeigt schematisch den Aufbau von DIRS-1, welches aus den beiden invertierten LTRs (*long terminal repeats*) und einer 4,5 kB langen mRNA besteht. Diese enthält drei überlappende ORFs (*open reading frames*), wobei ORF III Homologie zu anderen retroviralen reversen Transkriptasen aufweist (Cappello et al., 1985). DIRS-1 mRNA Transkripte akkumulieren während der Entwicklung von *D. discodium* (Cohen et al., 1984).

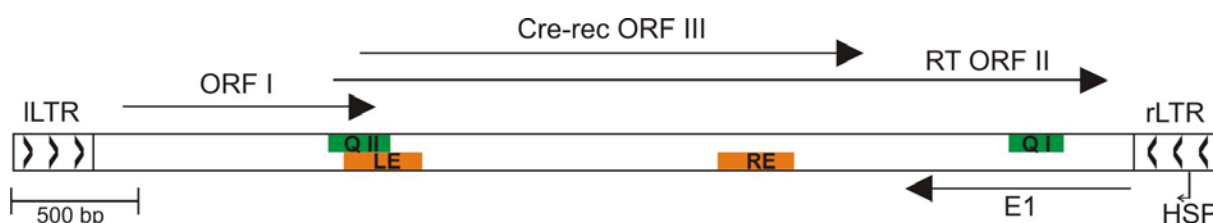


Abb. 9.14.: Schematische Darstellung des Retrotransposons DIRS-1. Die 4,8 kB große genomische Sequenz des Retrotransposons DIRS-1 besteht aus den beiden invertierten LTRs (*left bzw. right long terminal repeat*), den drei überlappenden ORFs (*open reading frame* I, II, III) und dem *antisense* Transkript E1. LE und RE markieren die Positionen der Sonden, die in Northern Blot Analysen zum Nachweis von längeren Transkripten und siRNAs genutzt wurden. Q I und Q II bezeichnen die Positionen, an denen die Expression von DIRS-1 durch qRT-PCR analysiert wurde. Als Grundlage für alle durchgeführten Analysen und diese maßstabsgetreue Darstellung diente die Sequenz von *clone* SB41 (GB_M11339.1).

Zusätzlich kann durch Hitzeschock und unter Stressbedingungen die Expression eines ca. 900 nt langen *antisense* Transkripts E1 durch einen Hitzeschock Promotor induziert werden, welches jedoch nicht unter axenischen Wachstumsbedingungen exprimiert wird (Rosen et al., 1983; Zuker et al., 1983).

Zur Analyse von DIRS-1 Transkripten wurden strangspezifische Ribo Sonden für die Positionen LE (*left end*) und RE (*right end*) am 5' Ende bzw 3' Ende von OFR III erstellt. (vgl. Abb. 9.14.). In allen untersuchten *rrpC* Deletionsstämmen konnte in Northern Blots an beiden Positionen eine starke Akkumulation von Transkripten nachgewiesen werden. Neben einem ca. 4500 nt langen DIRS-1 Volllänge Transkript, konnten Transkripte mit sehr heterogenen Längen detektiert werden (vgl. Abb. 9.15. A / C). In Northern Blots zum Nachweis von *antisense* Transkripten wurde in allen untersuchten Stämmen für beide Positionen ein ca. 4000 nt langes *antisense* Transkript nachgewiesen. Im Gegensatz zu *sense* Transkripten konnten bei diesem *antisense* Transkript keine signifikanten Mengenunterschiede zwischen den Deletionsstämmen festgestellt werden. Jedoch wurden in allen *rrpC* Deletionsstämmen zusätzliche kleinere Transkripte unterschiedlicher Längen, welche einen schwachen „Schmier“ bildeten, beobachtet (vgl. Abb. 9.15. B / D). Aufgrund der geringeren Signalintensität und der 5-fach höheren Expositionszeit dieser beiden Northern Blots zum Nachweis von *antisense* Transkripten, ist davon auszugehen, dass im Verhältnis wesentlich geringere Mengen *antisense* als *sense* Transkripte vorhanden sind. Als weitere, unabhängige Überprüfung der Transkription der DIRS-1 Elemente, wurden qRT-PCR Analysen von A. Schmith (AG T. Winckler, Friedrich-Schiller Universität, Jena) durchgeführt. In diesen konnte für die Positionen Q I und Q II eine 50 bis 100-fache Akkumulation von DIRS-1 Transkripten in allen *rrpC* Deletionsstämmen nachgewiesen werden, was die Resultate der durchgeführten Northern Blots bestätigt. Darüber hinaus wurden im Stamm *drnB*^{Δ-rox} eine 5 bis 10-fache Anreicherung von DIRS-1 Transkripten ermittelt, die jedoch nicht in den Northern Analysen beobachtet wurde (vgl. Abb. 9.15. E / F). Zusätzlich wurden DIRS-1 spezifische siRNAs in Northern Blot Analysen durch Einsatz von Oligonukleotid Sonden ebenfalls an den Positionen LE und RE untersucht. Hierbei wurde im Vergleich zu AX2 wt in allen *rrpC* Deletionsstämmen an Position LE eine deutliche Reduktion der DIRS-1 siRNAs auf unter 30% im Vergleich zu AX2 Wildtyp festgestellt. Deletionsstämme von *rrpA*, *rrpB* und *drnB* zeigten hingegen keine signifikanten Veränderungen. Für Position RE wurde ein ähnlicher Befund erzielt, jedoch mit einer etwas geringeren Reduktion (vgl. Abb. 9.16. A). Diese Resultate konnten in biologischen Replikaten, welche im Anhang (Abb. 13.1. und 13.2. A) aufgeführt sind, bestätigt werden.

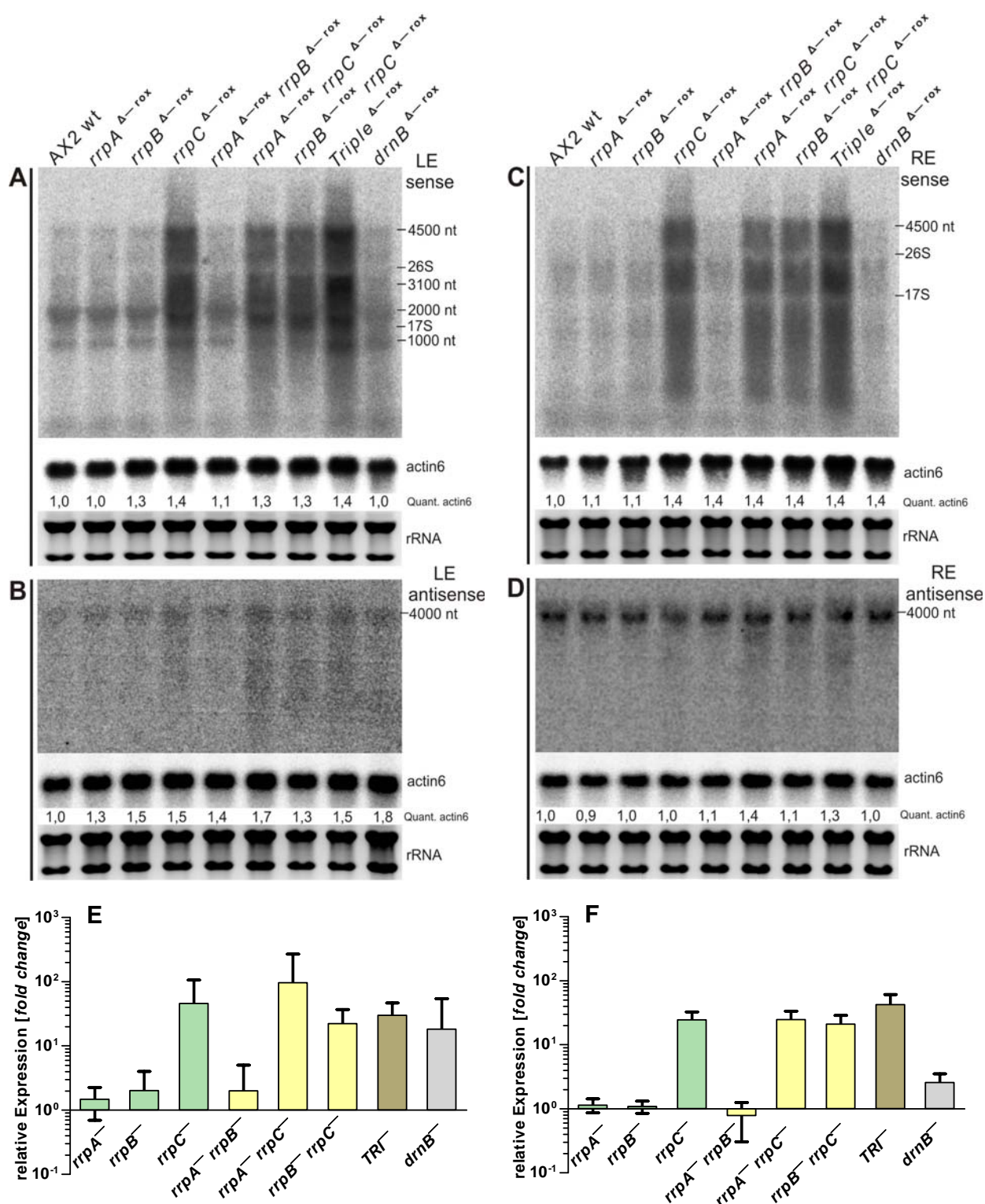


Abb. 9.15.: Nachweis von DIRS-1 Transkripten durch Northern Blot und qRT-PCR Analysen in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen. **A – D:** Zum Nachweis von DIRS-1 Transkripten in Northern Blots wurden strangspezifische Ribo Sonden verwendet. Lademengen wurden durch Ethidiumbromid-Färbung der rRNA im Agarosegel und Transfereffizienzen durch Nachweis der *actin6* mRNA (OLB Sonde) überprüft. **A und C:** Nachweis von *sense* Transkripten mit den Sonden LE und RE. Expositionszeit ≥ 1 Tag. **B und D:** Nachweis von *antisense* Transkripten mit den Sonden LE und RE. Expositionszeit 5 Tage. **E und F:** qRT-PCR Analyse an den Positionen Q II (E) bzw. Q I (F). Die Berechnung der relativen Expressionsrate erfolgte nach der „ $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode“ relativ zum Referenzgen *GAPDH* und in Bezug auf AX2 Wildtyp. Die graphische Darstellung beinhaltet Ergebnisse von sechs biologischen Replikaten. Die entsprechenden Standardabweichungen sind als Balken dargestellt. Durchführung und Auswertung dieser qRT-PCR Analysen erfolgte durch A. Schmith (AG T. Winckler, Friedrich-Schiller Universität, Jena); (unveröffentlicht).

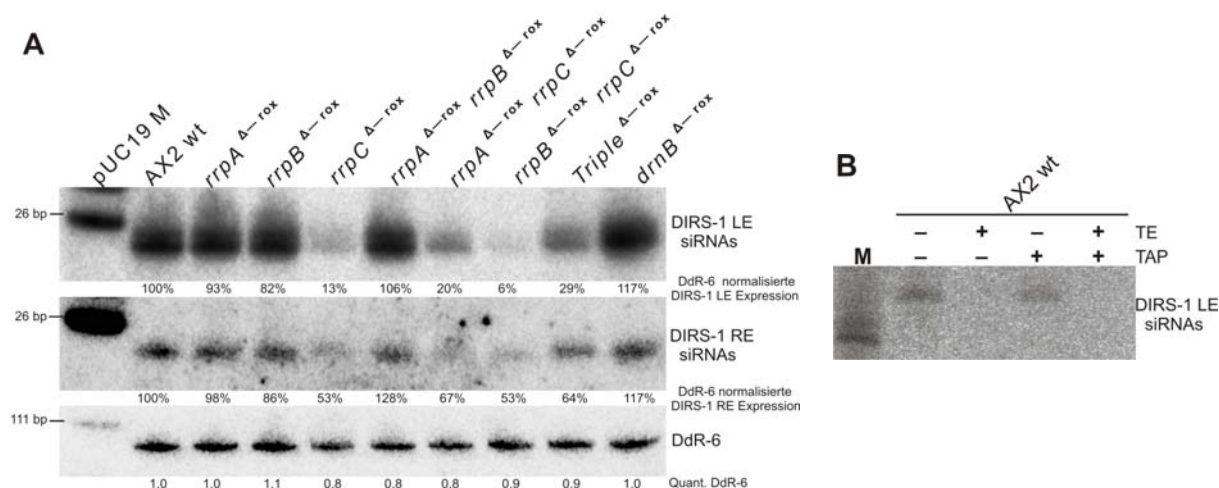


Abb. 9.16.: Nachweis von DIRS-1 siRNAs in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen.

A: Northern Blot zum Nachweis von DIRS-1 siRNAs mit den Oligonukleotid Sonden DIRS-1 LE siRNAs bzw. DIRS-1 RE siRNAs nach chemischen *Crosslinking*. Normalisierte siRNA Mengen wurden relativ zur Ladekontrolle DdR-6 berechnet. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas).

B: Northern Blot zur Charakterisierung des 5' Endes von siRNAs an Position LE. Hierfür wurden angereicherte siRNAs (PEG / NaCl Methode) mit TE (*Terminator 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease*) und / oder TAP (*Tabacco Acid Pyrophosphatase*) behandelt. Der anschließend durchgeführte Northern Blot wurde auch hier mit der Oligonukleotid Sonde DIRS-1 LE siRNAs hybridisiert. Das in B dargestellte Experiment wurde von L. Avesson (Dep. of Molecular Biology, SLU, Uppsala) durchgeführt (unveröffentlicht).

Durch L. Avesson (Dep. of Molecular Biology, SLU, Uppsala) wurde die chemische Struktur des 5' Endes der DIRS-1 spezifischen siRNAs an Position LE unter Verwendung der gleichen Oligonukleotid Sonde in Northern Blots genauer untersucht. Hierzu wurden im Vorfeld angereicherte siRNAs mit einer 5'-Monophosphat spezifischen RNA Exonuklease und / oder mit Pyrophosphatase (TAP) zur Erzeugung von RNA Molekülen mit 5'-Monophosphatrest, inkubiert. Der Nachweis der so behandelten siRNAs mit der Oligonukleotid Sonde DIRS-1 LE siRNAs zeigte, dass siRNAs an dieser Position einen 5'-Monophosphatrest jedoch kein 5'-Triphosphatrest, besitzen (vgl. Abb. 9.16. B).

In Kooperation mit F. Söderbom (Dep. of Molecular Biology, SLU, Uppsala) wurden zur genaueren Charakterisierung von DIRS-1 spezifischen siRNAs *deep sequencing* Analysen von AX2 wt und *rrpC* ^{Δ -rox} durchgeführt. Die Auswertung der Daten wurde von C. Seehafer (AG Ribogenetics, TU Darmstadt) vorgenommen und ist in Abbildung 9.17. dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die meisten endogenen *D. discoideum* siRNAs DIRS-1 Elementen zugeordnet werden können. In AX2 wt sind diese über den gesamten Sequenzbereich von DIRS-1 heterogen verteilt, wobei sie vor allem im Bereich der ORFs deutlich akkumulieren. Nur am 5' Ende von ORF I konnten keine DIRS-1 siRNAs in AX2 wt nachgewiesen werden. Die *deep sequencing* Analysen für *rrpC* ^{Δ -rox} zeigen, dass in diesem Stamm der größte Teil der DIRS-1 spezifischen siRNAs nicht mehr vorhanden ist. Dies gilt insbesondere für die Bereiche der ORFs (Rechtecke II und III in Abb. 9.17.). Die deutliche Reduktion in diesen

beiden Bereichen unterscheidet sich allerdings qualitativ: im Bereich II bleibt das Verteilungsmuster im Vergleich zu AX2 wt ähnlich, während im Bereich III siRNAs im *rrpC* Deletionsstamm fast völlig abwesend sind. Die im Bereich der beiden LTRs lokalisierten siRNAs werden durch die Deletion von *rrpC* nicht beeinflusst (vgl. Abb. 9.17. Rechteck I). Interessanterweise konnten am 5' Ende von ORF I (~ +210 nt in ORF I), DIRS-1 siRNAs lokalisiert werden, welche nur in *rrpC*^{Δ-rox} jedoch nicht in AX2 wt auftraten (vgl. Abb. 9.17. Rechteck IV). Diese Ergebnisse bestätigen und ergänzen die in Northern Blot Analysen ermittelte Reduktion von DIRS-1 spezifischen siRNAs in *rrpC* Deletionsstämmen an den Positionen LE und RE (vgl. Abb. 9.16. A).

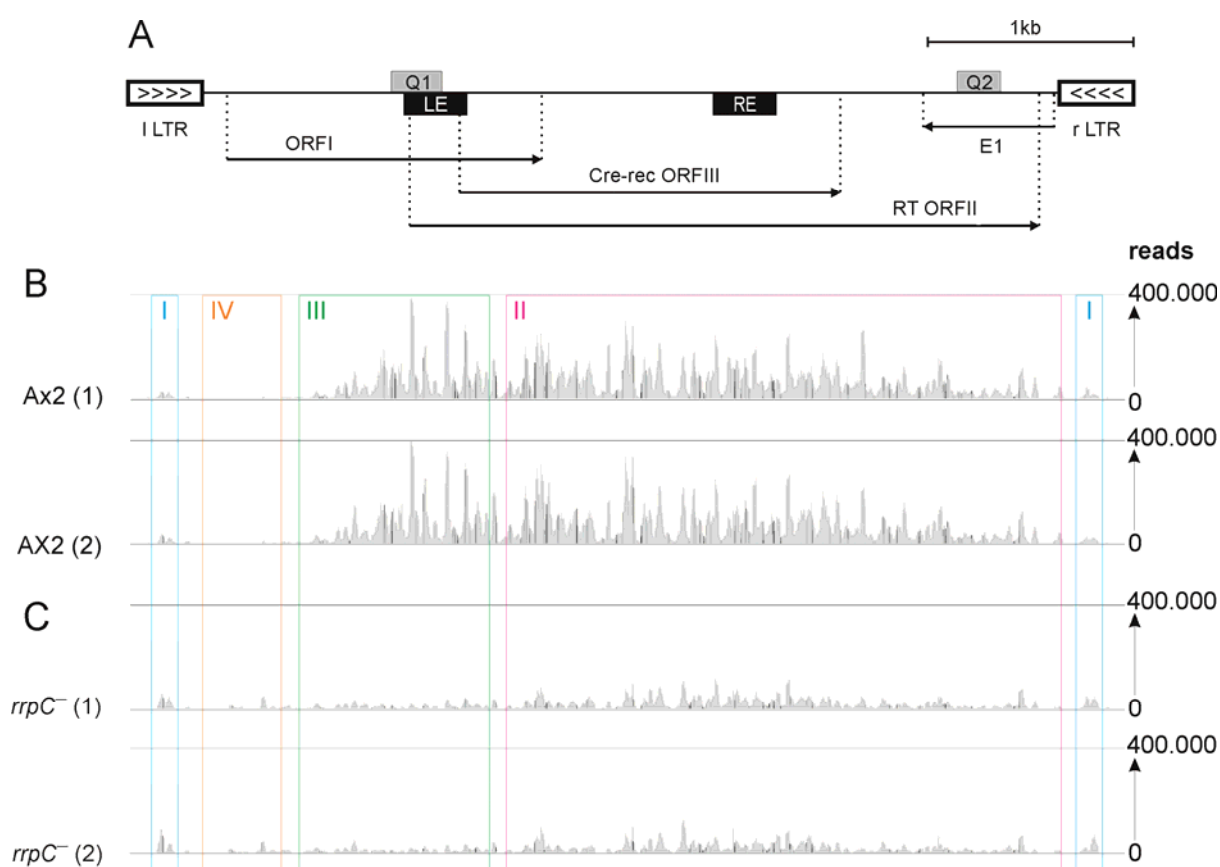


Abb. 9.17.: DIRS-1 spezifische siRNAs in AX2 wt und *rrpC*^{Δ-rox}. **A:** Schematische Darstellung des Retrotransposons DIRS-1. **B und C:** *Deep sequencing* Daten von DIRS-1 für AX2 (B) und *rrpC*^{Δ-rox} (C) in den biologischen Replikaten (1) und (2). Signalstärken und Positionen entsprechen dem Vorkommen von DIRS-1 siRNAs an den jeweiligen Positionen. Alle „siRNA reads“ wurden in gleicher Skalierung dargestellt, welche zwischen 0 und 400000 „reads“ variierten. Details zu den eingerahmten Bereichen siehe Text. Auswertung und Darstellung dieser *deep sequencing* Daten erfolgte durch C. Seehafer (AG Ribogenetics, TU Darmstadt); (unveröffentlicht).

9.5.2. Retrotransposon Skipper

Skipper ist neben DIRS-1 ein in *D. discoideum* relativ häufig vorkommendes LTR Retrotransposon. Das Genom enthält zwei vollständige und ca. 50 zum Teil sehr stark fragmentierte Kopien dieses Retrotransposons (Eichinger et al., 2005). Abbildung 9.18. zeigt schematisch den Aufbau des 7 kB großen genomischen Retrotransposons, welches aus zwei identischen LTRs in gleicher Orientierung und drei zum Teil überlappenden ORFs besteht. Hierbei kodieren ORF I für GAG (Matrix Protein), ORF II für PRO (Protease) und ORF III für RT (reverse Transkriptase), POL (Polymerase) und INV (Invertase). Auch wurde ein ca. >6000 nt langes von LTR zu LTR reichendes Skipper Transkript beschrieben (Leng et al., 1998). Durch Bisulfitsequenzierung konnte gezeigt werden, dass die genomische Sequenz dieses Retrotransposons methyliert ist. Ein Verlust dieser Modifizierung führte zu erhöhter Transkription und Mobilisierung des Elements (Kuhlmann et al., 2005). 2007 wurden erstmalig in *RNA-seq* Analysen und durch Northern Blots Skipper spezifische siRNAs nachgewiesen, welche im *rrpC*[−] Stamm akkumulierten. Diese siRNAs resultieren möglicherweise aus einer *hairpin* Struktur im Bereich von ORF I (Hinas et al., 2007). Interessanterweise wurde diese vorhergesagte *hairpin* Struktur nur in einem Skipper Fragment, welches auf Chromosom 2 lokalisiert ist, gefunden (Details vgl. Abb. 10.2.).

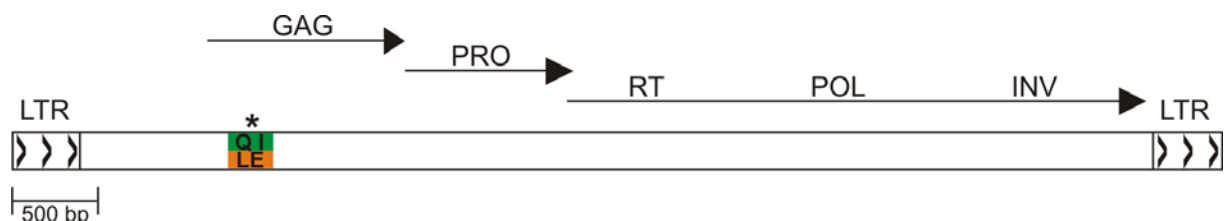


Abb. 9.18.: Schematische Darstellung des Retrotransposons Skipper. Die 7 kB große genomische Sequenz des Retrotransposons Skippers, besteht aus den beiden identischen LTRs in gleicher Wiederholung und den drei zum Teil überlappenden ORFs. Diese kodieren für GAG (Matrix Protein), PRO (Protease), RT (reverse Transkriptase), POL (Polymerase) und INV (Invertase). Abweichend von dieser Organisation der ORFs, welche nur ein Skipper Element widerspiegelt und von Leng et al. 2004 publiziert wurde, konnte in umfassenderen Analysen der genomischen Skipper Sequenzen nur noch zwei ORFs identifiziert. ORF I kodiert hierbei für GAG, während PRO, RT, POL und INV einen durchgehenden ORF II bilden (persönliche Mitteilung T. Winckler, Friedrich-Schiller Universität, Jena). QI bzw. LE bezeichnet die Position, an welcher qRT-PCR Analysen und Northern Blots zum Nachweis von siRNAs durchgeführt wurden. * markiert *hairpin* Strukturen. (Details vgl. Abb. 10.2.). Als Grundlage für alle durchgeführten Analysen und diese maßstabsgetreue Darstellung diente die Sequenz GB_AF049230.1.

Da sich bisherige Experimente (Hinas et al., 2007; Kuhlmann et al., 2005) auf einen *rrpC*[−] Stamm ohne vollständige Deletion von Helicase und RdRP Domäne beschränkten, wurde eine vollständige Analyse aller neu erstellten RdRP Deletionsstämme durchgeführt. Hierfür wurde ein Bereich am 5' Ende von GAG ausgewählt, welcher die *hairpin* Strukturen miteinbezieht (vgl. Abb. 9.18. Position LE). Wie für DIRS-1 wurden in Kooperation mit T.

Winckler qRT-PCR Analysen durch A. Schmith (AG T. Winckler, Friedrich-Schiller Universität, Jena) an dieser Position durchgeführt. Dabei wurde in allen *rrpA* Deletionsstämmen eine ca. 10-fache und in *drnB*^{Δ-rox} eine 100-fache Hochregulation von Skipper Transkripten beobachtet. Dagegen wurden in *rrpC* Deletionsstämmen nur geringfügige Änderungen beobachtet (vgl. Abb. 9.19. A). Obwohl diese Analysen für sechs biologische Replikate durchgeführt wurden, traten relativ hohe Varianzen zwischen den Messungen auf.

Die Analyse von Skipper spezifischen siRNAs erfolgte ebenfalls an Position LE. Hierbei wurde in den Northern Blot Analysen eine Oligonukleotid Sonde eingesetzt, welche mit dem *loop* Bereich der putativen *hairpin* Struktur hybridisieren kann. Dabei waren Skipper spezifische siRNAs in AX2 wt kaum derektierbar, jedoch in allen *rrpC* Deletionsstämmen waren diese drastisch hochreguliert. Weiterhin konnte eine schwache Akkumulation von siRNAs in *rrpA*^{Δ-rox} und *drnB*^{Δ-rox} festgestellt werden (vgl. Abb. 9.19. B; biologische Replikate Abb.13.1. und 13.2. B im Anhang).

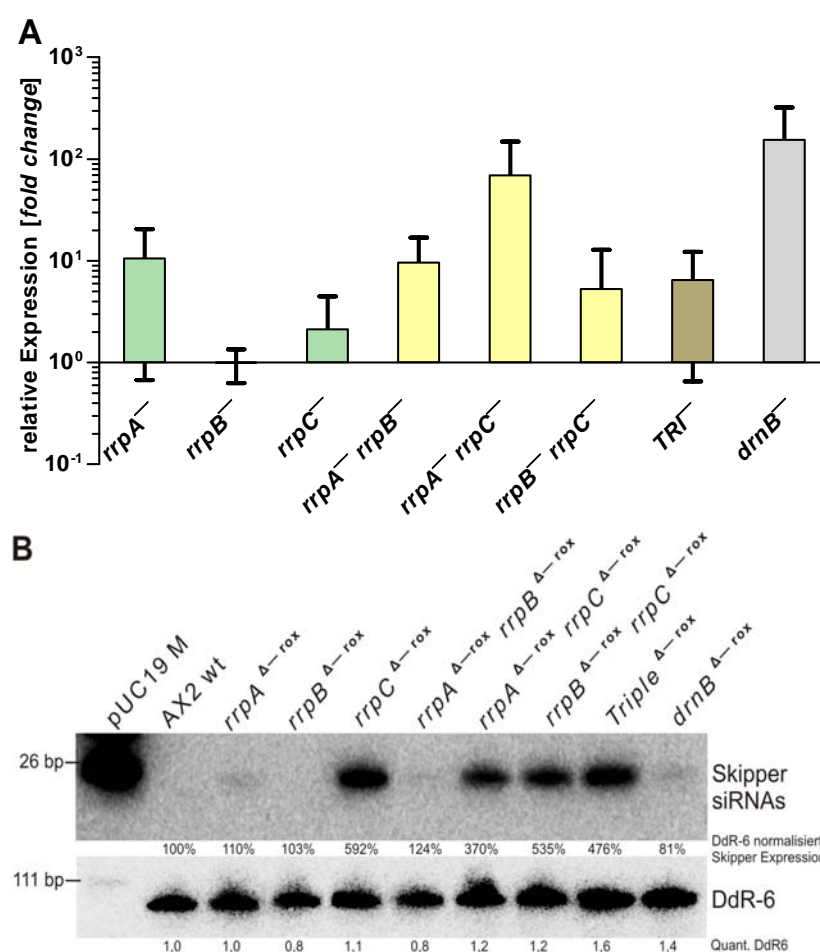


Abb. 9.19.: Skipper Transkripte in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen.

A: qRT-PCR Analyse an Position Q I. Die Berechnung der relativen Expressionsrate erfolgte nach der „ΔΔCT- Methode“ relativ zum Referenzgen *GAPDH* und in Bezug auf AX2 Wildtyp. Die Ergebnisse umfassen sechs biologische Replikate und die entsprechenden Standardabweichungen sind als Balken dargestellt. Die Durchführung und Auswertung dieser qRT-PCR Messungen erfolgte durch A. Schmith (AG T. Winckler, Friedrich-Schiller Universität, Jena); (unveröffentlicht).

B: Northern Blot an Position LE mit Immobilisierung der RNA durch chemisches *Crosslinking*. Detektion von Skipper siRNAs erfolgte mit Oligonukleotid Sonde SW99. Nachweis von DdR-6 RNA diente als Lade- und Transferkontrolle. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas).

Auch hier wurden zur genaueren Charakterisierung der Skipper spezifischen siRNAs die für AX2 wt und *rrpC*^{Δ-rox} durchgeführten *deep sequencing* Analysen von C. Seehafer (AG Ribogenetics, TU Darmstadt) herangezogen. Es zeigte sich, dass in AX2 wt nur sehr wenige Skipper spezifische siRNAs vorhanden waren. Jedoch konnten zwei „hot spots“ identifiziert werden, in welchen Skipper spezifische siRNAs im *rrpC*^{Δ-rox} Stamm akkumulieren (vgl. Rechtecke in Abb. 9.20.). Der erste Locus am 5' Ende von ORF I entspricht dem Bereich mit *hairpin* Strukturen. Diese siRNAs wurden auch bereits in den Northern Blot Analysen gefunden (vgl. Abb. 9.20.). Ein zweite „hot spot“ befindet sich im Bereich des ORF von PRO. Skipper siRNAs waren im ersten Bereich asymmetrisch auf *sense* und *antisense* Strang verteilt, was für den für den zweiten „hot spot“ weniger stark ausgeprägt war. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in *rrpC* Deletionsstämmen beobachtete Anhäufung von siRNAs zu keinen großen Änderungen in der Transkription von Skipper führte. Skipper Transkription ist hingegen in *rrpA* und vor allem im *drnB* Deletionsstämmen deutlich erhöht, während in diesen die Mengen der Skipper siRNAs kaum verändert sind.

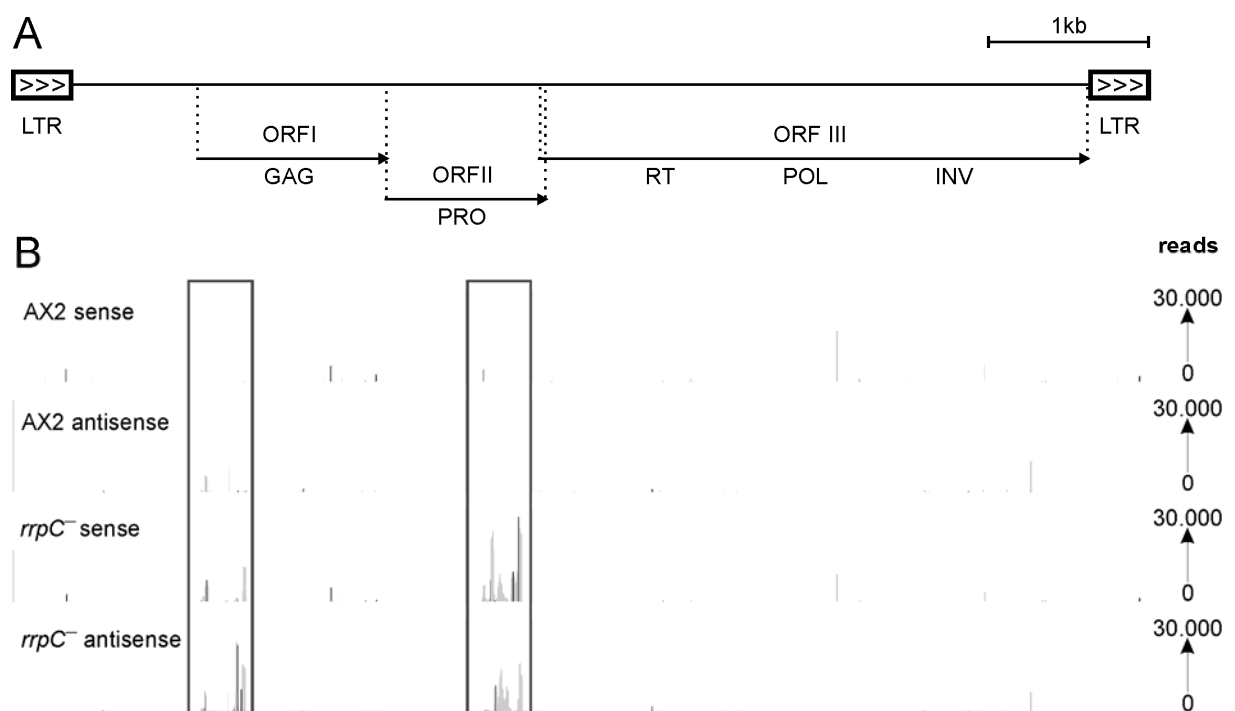


Abb. 9.20.: Skipper spezifische siRNAs in AX2 wt und *rrpC*^{Δ-rox}. **A:** Schematische Darstellung des Retrotransposons Skipper. **B:** *Deep sequencing* Daten von Skipper für AX2 und *rrpC*^{Δ-rox}. Signalstärken und Positionen entsprechen dem Vorkommen von Skipper siRNAs an den jeweiligen Positionen auf dem *sense* bzw. *antisense* Strang. Alle „siRNA reads“ wurden in gleicher Skalierung dargestellt, welche zwischen 0 und 30000 „reads“ variierten. Eingerahmte Bereiche markieren Unterschiede zwischen den beiden Stämmen; Details hierzu siehe Text. Auswertung und Darstellung dieser *deep sequencing* Daten erfolgte durch C. Seehafer (AG Ribogenetics, TU Darmstadt); (unveröffentlicht).

9.5.3. microRNAs

Durch *RNA-seq* Analysen in Kombination mit bioinformatischen Methoden konnten im Transkriptom von *D. discoideum* microRNAs identifiziert werden, deren Biogenese von *drnB* abhängig ist. Auch wurde eine Hochregulation dieser im *rrpC*[−] Stamm nachgewiesen (Hinas et al., 2007). Da jedoch auch diese Analysen nur für den *rrpC*[−] Stamm ohne vollständige Deletion von Helicase und RdRP Domäne durchgeführt wurden, erfolgte eine erneute Untersuchung von miRNA in den neu erstellen RdRP Deletionsstämmen.

In Northern Blots wurden miRNAs durch Einsatz radioaktiv markierter Oligonukleotide nachgewiesen. Die für mica1190 und mica1198 durchgeführten Analysen zeigten, dass diese wie Skipper siRNAs in allen *rrpC* Deletionsstämmen akkumulierten. In allen anderen RdRP Deletionsstämmen konnten im Vergleich zu AX2 wt keine Unterschiede beobachtet werden. Die Abhängigkeit der miRNAs von DrnB konnte bestätigt werden, da diese im Deletionsstamm *drnB*^{Δ-rox} nicht mehr nachweisbar waren (vgl. Abb. 9.21.; biologische Replikate Abb. 13.3. im Anhang).

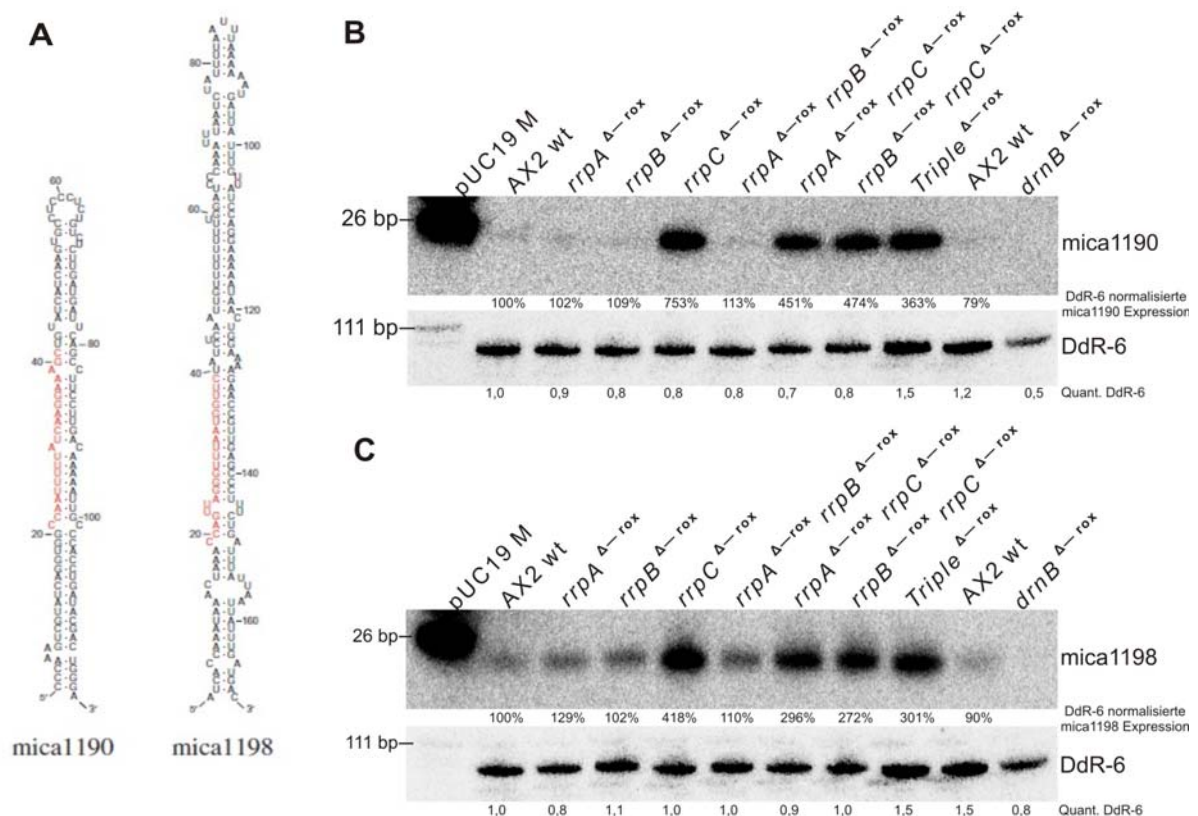


Abb.9.21.: Nachweis von miRNAs in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen. **A:** Vorhergesagte Sekundärstruktur der umgebenden Sequenzen der microRNA Kandidaten mica1190 und mica1198. Die Sequenz von mica1190 und mica1198 ist in rot hervorgehoben (Abb. aus Hinas et al., 2007). **B und C:** Northern Blot zum Nachweis von mica1190 (B) und mica 1198 (C) mit den Oligonukleotid Sonden mica1190 bzw. mica1198 nach chemischen *Crosslinking*. Normalisierte miRNA Mengen wurden relativ zur Ladekontrolle DdR-6 berechnet. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas).

9.6. Das CadA Reportersystem

9.6.1. Konzeption des CadA Reportersystems

Zur Untersuchung der Funktion der RdRPs im RNA Interferenz Mechanismus von *D. discoideum* wurde ein neues Reportersystem entwickelt, da mit dem zunächst verwendeten Discoidin Reportsystem keine reproduzierbare Analyse erfolgen konnte (vgl. Abschnitt 9.3.2.). Als endogenes Zielgen für dieses Reportersystem wurde *cadA* (*calcium-dependent cell adhesion molecule-1*) ausgewählt, da es in einfacher Kopie im Genom vorliegt, keiner Genfamilie angehört und nicht essentiell für *D. discoideum* ist. Auch zeigen *cadA knock out* Stämme nur während des Entwicklungszykluses phänotypische Veränderungen wie verminderte Sporulation, verzögerte Kulmination, erhöhte *prestalk cell* Differenzierung und phänotypische Entwicklung zu „multiple tips“ (Wong et al., 2002). Diese phänotypischen Veränderungen beeinflussen jedoch die Untersuchung des RNAi Mechanismus in vegetativ wachsenden Zellen nicht. Durch Northern Blot Analysen konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass die 642 nt lange *cadA* mRNA relativ stark und konstant in vegetativen Zellen exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus ist ein spezifischer Antikörper zum Nachweis des Proteins verfügbar (Sriskanthadevan et al., 2009), welcher freundlicherweise von S. Sriskanthadevan (Banting and Best Dep. of Medical Research, University Toronto) für diese Studien zur Verfügung gestellt wurde.

Bei diesem Reportersystem sollte durch Expression verschiedener *cadA Silencing* Konstrukte, welche in Abbildung 9.22. aufgeführt sind, die *cadA* mRNA reduziert oder vollständig entfernt werden. Zur Untersuchung von RNAi in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen, wurde das *cadA hairpin II* Konstrukt hergestellt, welches mit einem ca. 500 bp langen doppelsträngigen Bereich, große Teile des Gens abdeckt. Dafür wurde zunächst der *antisense* mit *loop* Bereich und dann der *sense* Bereich in den Vektor pDM304 (Veltman et al., 2009a) kloniert. Als Variation wurde bei *cadA hairpin III* und IV der doppelsträngige Bereich auf ca. 200 bp des 5' Endes von *cadA* reduziert und mit *sense*; *loop*, *antisense* die Fragmentreihenfolge im Vektor im Vergleich zum *hairpin II* umgedreht. Bei *cadA hairpin III* beginnt das *sense* Fragment mit dem ATG Startcodon von *cadA*, während dieses bei *cadA hairpin IV* entfernt wurde. Zusätzlich wurde das Konstrukt *cadA sense* erstellt, das eine mRNA ohne Startcodon kodiert. Damit sollte untersucht werden, ob Co-Suppression in *D. discoideum* ausgelöst werden kann. Schließlich wurde ein *antisense* Konstrukt (*cadA antisense*) generiert. Die beiden letztgenannten Konstrukte kodieren für RNAs, die der Länge der *cadA* mRNA entsprechen (Details zur Konzeption vgl. Abb. 9.22.).

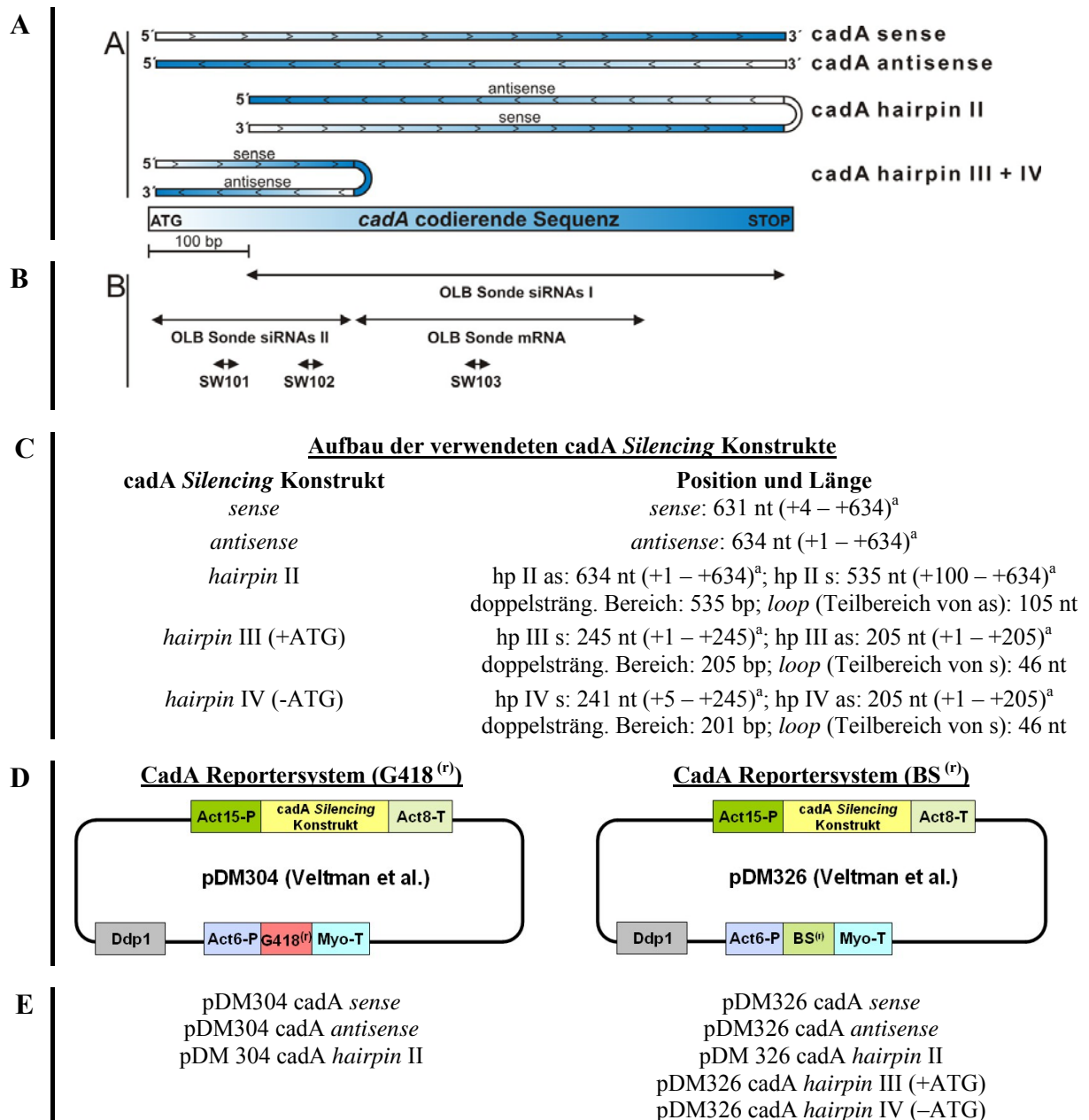


Abb. 9.22.: Konzeption des CadA Reportersystems. **A:** Schematische, maßstabsgetreue Darstellung der verwendeten *cadA* Silencing Konstrukte. **B:** Positionen der eingesetzten Sonden zum Nachweis von *cadA* mRNA (Oligonukleotid SW101, OLB Sonde mRNA), siRNAs (OLB Sonde siRNAs I und II) und antisense RNA (Oligonukleotide SW102, SW103). **C:** Details zum Aufbau der verwendeten *cadA* Silencing Konstrukte. ^a Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Startcodon der kodierenden Sequenz von *cadA*. **D:** Verwendete extrachromosomale Vektoren zur Expression von *cadA* Silencing Konstrukten unter Genitizin- (pDM304) bzw. Blasticidin-Resistenz (pDM326). Ddp1 bezeichnet den Lokus, welcher für die Replikation von extrachromosomalen Vektoren in *D. discoideum* notwendig ist. **E:** Übersicht über die hergestellten Vektoren des CadA Reportersystems (Klonierungsstrategie und Vektorkarten vgl. 13.1.6. und 13.1.8.).

Zur Expression der *cadA* Silencing Konstrukte wurden extrachromosomale Vektoren der pDM Serie (Veltman et al., 2009a) verwendet. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie bei geringen Klon zu Klon Varianzen eine starke Expression der Konstrukte ermöglichen und hohe Transformationseffizienzen mit großen Einzelklonausbeute, liefern. Um auch Analysen in Stämmen mit bereits genutzter Blasticidin-Resistenz durchführen zu können, wurden zur Expression zunächst pDM304 Vektoren mit Genitizin-Selektionsmarker verwendet. Da

jedoch mit dem Vektor pDM326 *cadA hairpin II* eine stärkere Reduktion der CadA Expression erzielt werden konnte, wurden die pDM326 Vektoren mit Blasticidin-Selektionsmarker nachfolgend bevorzugt, eingesetzt. Die verschiedenen *cadA Silencing* Konstrukte wurden mittels Elektroporation in die zu untersuchenden RdRP und *drnB* Deletionsstämme transformiert. Nach Selektion für mindestens zwei Wochen wurden die Transformationspopulationen in Schüttelkultur überführt und erneut für eine Woche selektiert. Zur Analyse der Transformationspopulationen erfolgten zum gleichen Zeitpunkt die Entnahme von Proben für Western Blots und die Aufreinigung von Gesamt-RNA für Northern Blots zum Nachweis von mRNA und siRNAs. Gegebenenfalls wurden durch Subklonierung Einzelklone generiert, welche nachfolgend in Einzelklonanalysen, wie für das Discoidin Reportersystem beschrieben, untersucht wurden.

9.6.2. Analyse von pDM304 *cadA hairpin II* in RdRP *single* Deletionsstämmen

Zunächst wurde der Vektor pDM304 *cadA hairpin II* in RdRP *single* Deletionsstämme transformiert. Dabei wurde für AX2 wt, *rrpA*^{Δ-rox} und *rrpB*^{Δ-rox} eine Reduktion der *cadA* mRNA und der Proteinhmenge um ca. 50% festgestellt (vgl. Abb. 9.23. A, C). Für *rrpC*^{Δ-rox} hingegen konnte weder für die mRNA noch bei der Proteinmenge eine signifikante Reduktion festgestellt werden. In Northern Blots wurden in allen Stämmen *cadA* siRNAs nachgewiesen (vgl. Abb. 9.23. B), während die exprimierte *hairpin* RNA in Volllänge nicht mehr nachzuweisen war (Daten nicht gezeigt). Nach diesen Analysen in Transformationspopulationen wurde im Anschluss für AX2 wt und *rrpC*^{Δ-rox} die individuelle Stärke des *Silencings* in einzelnen Klonen mittels Western Blot untersucht. Hierbei zeigte sich wie beim Discoidin Reportersystem eine Varianz in der *Silencing*-Stärke in den untersuchten Klonen zwischen 0% und 100% *Silencing* (vgl. Tab. 9.13.). Im Gegensatz zu den Transformationspopulationen konnte in Einzelklonen kein signifikanter Unterschied zwischen AX2 wt und *rrpC*^{Δ-rox} festgestellt werden. Da bei Verwendung des Vektors pDM326 *cadA hairpin II* eine höhere Reduktion der CadA Expression erzielt werden konnte, wurde mit diesem Vektor die Analyse der RdRP *single* Deletionsstämme wiederholt (vgl. Abschnitt 9.6.4.).

Tab. 9.13.: Western Blot Analyse nach Transformation von pDM304 *cadA hairpin II* (Einzelklonanalyse).

Deletionsstamm + pDM304 <i>cadA hp II</i>	CadA Expression (# Einzelklone) ^a				Σ untersuchte Einzelklone
	100 – 75%	75 – 50%	50 – 25%	25 – 0%	
AX2 wt	8	2	6	8	24
<i>rrpC</i> ^{Δ-rox}	7	3	4	10	24

^a Durchführung der Western Blots analog zu Abbildung 9.21. Klone wurden entsprechend der noch vorhandenen CadA Expression in vier Gruppen unterteilt.

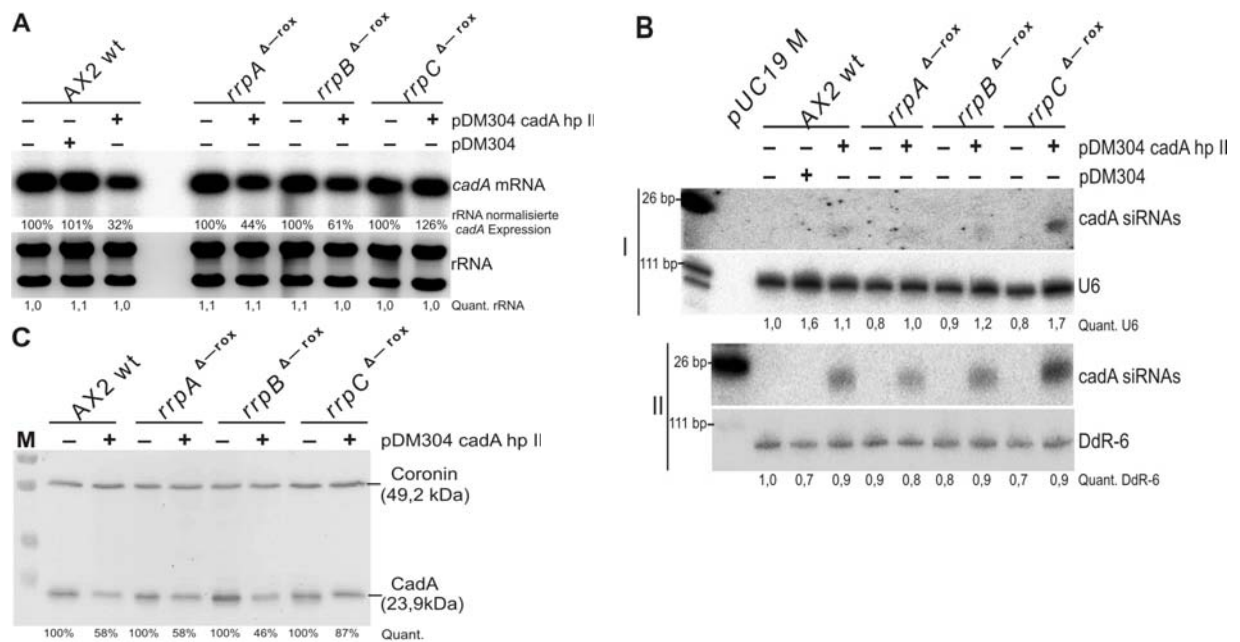


Abb. 9.23.: Analyse von *cadA* nach Transformation von pDM304 *cadA hairpin II* in RdRP *single Deletionsstämme*. **A:** Northern Blot zum Nachweis von *cadA* mRNA in den angegebenen Stämmen mit Hilfe der Sonde SW101. Die Normalisierung der *cadA* mRNA erfolgt relativ zur rRNA Menge des jeweiligen Stamms. **B:** Northern Blot zum Nachweis von *cadA* siRNAs mit der OLB Sonde siRNAs I nach UV-Crosslinking (I) oder chemischen Crosslinking (II). Lademengen und Transfereffizienzen wurden über U6 RNA (I) bzw. DdR-6 RNA (II) überprüft. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas). **C:** Western Blot zum semiquantitativen Nachweis von CadA und Coronin als Transferkontrolle. Die Quantifizierung der CadA Proteinmenge erfolgte jeweils relativ zum untransformierten RdRP Deletionsstamm. M bezeichnet den verwendeten Größenstandard (#SM1811 Fermentas).

9.6.3. Analyse von pDM304 *cadA hairpin II* in *rrpA*^{—H.M.}

Mit Hilfe des Discoidin Reportersystems, konnte durch H. Martens (Abt. Genetik, Universität Kassel) gezeigt werden, dass *rrpA* für das *Silencing* eines Endogens durch Expression einer *hairpin* RNA essentiell ist (Martens et al., 2002). Da jedoch dieses Ergebnis bei der Analyse der RdRP *knock out* Stämme mit Hilfe des Discoidin Reportersystems nicht reproduziert werden konnte (vgl. Abschnitt 9.3.2.), sollte nun der von H. Martens verwendete *rrpA knock out* Stamm, welcher zuvor in Southern Blots verifiziert werden konnte (vgl. Abschnitt 9.3.1.), mit Hilfe des CadA Reportersystems erneut untersucht werden. Da der Blasticidin-Selektionsmarker aus diesem Stamm nicht entfernt werden kann, wurde hierfür der Vektor pDM304 *cadA hairpin II* verwendet. In den untersuchten Transformationspopulationen konnte auch hier eine Reduktion der *cadA* mRNA und der Proteinmenge um mindestens 50% in AX2 wt und in *rrpA*^{—H.M.} beobachtet werden (vgl. Abb. 9.24.). Weiterhin wurde kein signifikanter Unterschied zwischen AX2 wt und dem untersuchten *rrpA knock out* Einzelklonen festgestellt (vgl. Tab. 9.14.).

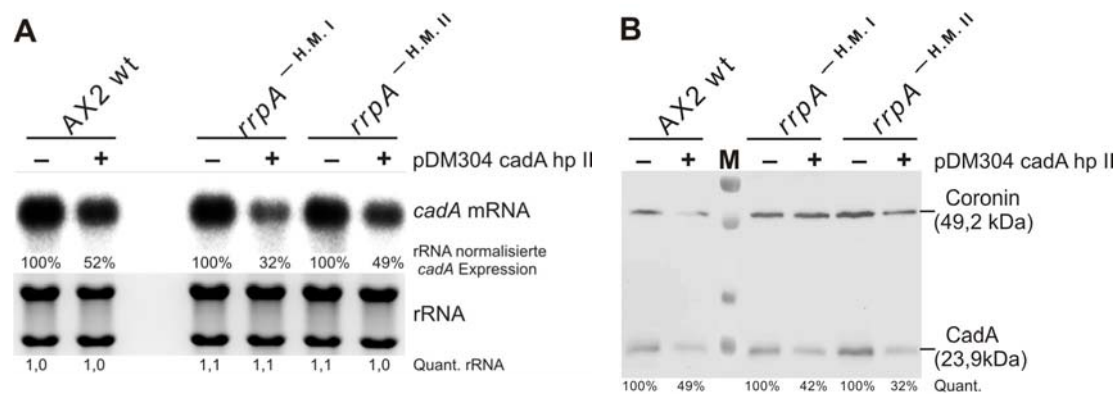


Abb. 9.24.: Analyse von *cadA* nach Transformation von pDM304 *cadA hairpin II* in *rrpA*^{-H.M.}
A: Northern Blot zum Nachweis von *cadA* mRNA in AX2 wt bzw. *rrpA*^{-H.M.} mit Hilfe der Sonde SW101. Die Normalisierung der *cadA* mRNA erfolgte relativ zur rRNA Menge des jeweiligen Stamms. **B:** Western Blot zum semiquantitativen Nachweis von CadA und Coronin als Transferkontrolle. Die Quantifizierung der CadA Proteinmenge erfolgte jeweils relativ zu AX2 wt bzw. dem untransformierten Stamm *rrpA*^{-H.M.}. M bezeichnet den verwendeten Größenstandard (#SM1811 Fermentas). *rrpA*^{-H.M. I} und *rrpA*^{-H.M. II} bezeichnen unterschiedliche Sporenproben desselben *knock out* Stamms (H. M., Henrik Martens).

Tab. 9.14.: Western Blot Analyse nach Transformation von pDM304 *cadA hairpin II* in *rrpA*^{-H.M.}.

knock out Stamm + pDM304	CadA Expression (Anzahl Einzelklone)				Σ untersuchter Einzelklone
	100 – 75%	75 – 50%	50 – 25%	25 – 0%	
AX2 wt ^a	2	3	2	8	15
<i>rrpA</i> ^{-H.M. I}	2	3	2	8	15
<i>rrpA</i> ^{-H.M. II}	4	4	3	5	15

^a Durchführung der Western Blots analog zu Abb. 9.24. Klone wurden entsprechend der noch vorhandenen CadA Expression in 4 Gruppen unterteilt (H. M., Henrik Martens).

9.6.4. Analyse von pDM326 *cadA hairpin II* in RdRP Deletionsstämmen

Da mit dem Vektor pDM304 *cadA hairpin II* (Geneticin-Resistenz) nur eine Reduktion der CadA Expression in AX2 wt um ca. 50% erzielt werden konnte (vgl. Abschnitt 9.6.2.), wurde zur Optimierung des Reportersystems das *cadA hairpin II* Konstrukt in den Vektor pDM326 mit Blasticidin-Selektionsmarker kloniert. Die nachfolgende Transformation in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen und die Analyse der Transformationspopulationen erfolgte analog zum Vektor pDM304 *cadA hairpin II*.

Die in Abbildung 9.25. zusammengefassten Daten zeigen, dass mit diesem Vektorsystem bei gleichem *hairpin* Konstrukt ein deutlich verbessertes *Silencing* von *cadA* erzielt werden konnte. In allen untersuchten RdRP und *drnB* Deletionsstämmen wurde eine Reduktion der *cadA* mRNA zwischen 70% und 90% beobachtet, welche vergleichbar zur Reduktion in AX2 wt ist. Auch hier konnte die exprimierte *hairpin* RNA in Volllänge in Northern Blots nicht mehr beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). CadA Proteinmengen waren in allen RdRP Deletionsstämmen wie bei AX2 wt um 70% - 95% reduziert. Im Gegensatz dazu, wurde für *drnB*^{Δ-rox} keine signifikante Reduktion der Proteinmenge festgestellt.

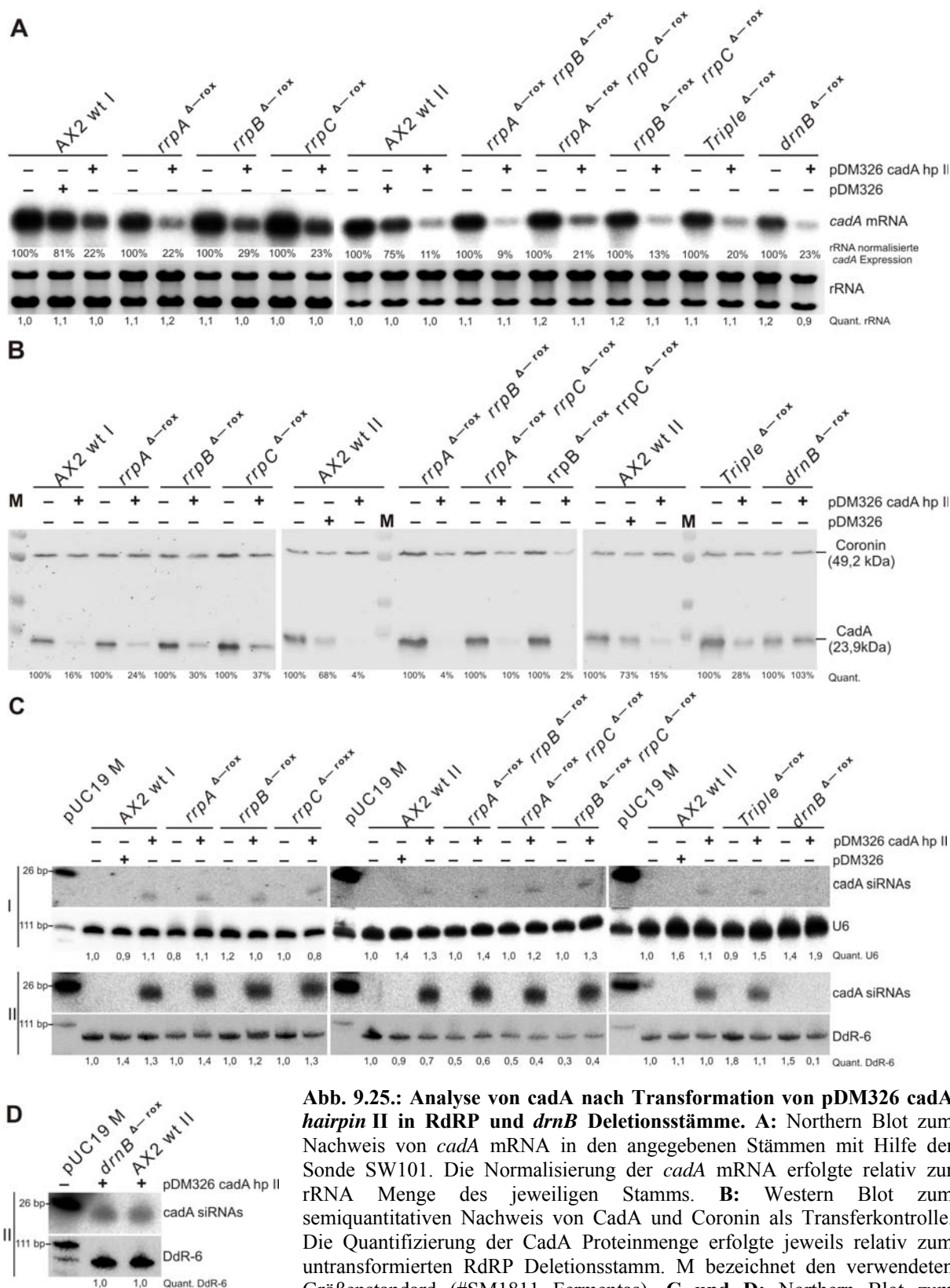


Abb. 9.25.: Analyse von *cadA* nach Transformation von pDM326 *cadA hairpin II* in RdRP und *drnB* Deletionsstämme. **A: Northern Blot zum Nachweis von *cadA* mRNA in den angegebenen Stämmen mit Hilfe der Sonde SW101. Die Normalisierung der *cadA* mRNA erfolgte relativ zur rRNA Menge des jeweiligen Stamms. **B:** Western Blot zum semiquantitativen Nachweis von CadA und Coronin als Transferkontrolle. Die Quantifizierung der CadA Proteinmenge erfolgte jeweils relativ zum untransformierten RdRP Deletionsstamm. M bezeichnet den verwendeten Größenstandard (#SM1811 Fermentas). **C und D:** Northern Blot zum Nachweis von *cadA* siRNAs mit der OLB Sonde siRNAs I nach UV-Crosslinking (I) oder chemischen Crosslinking (II). Lademengen und Transfereffizienzen wurden über U6 RNA (I) bzw. DdR-6 RNA (II) überprüft. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas). AX2 wt I und AX2 wt II bezeichnen biologische Replikate.**

CadA siRNAs im doppelsträngigen Bereich des *hairpin* Konstrukts konnten ebenfalls in allen untersuchten Stämmen nachgewiesen werden. Der Nachweis für *cadA* siRNAs im Stamm *drnB*^{Δ-rox} wurde erst in einem technischen Replikat erbracht (vgl. Abb. 9.25. D).

Die in AX2 wt durchgeführten Transformationen des leeren Vektors pDM326 zeigten, dass auch durch diesen bzw. der damit verbundenen Expression des Blasticidin-Selektionsmarkers eine Reduktion der CadA Expression auf RNA- und Proteinebene um maximal 30% im Vergleich zu AX2 wt auftrat (vgl. Abb. 9.25. A / B). Dies wurde jedoch nicht in allen untersuchten biologischen Replikaten beobachtet (vgl. Abb. 9.26.; 9.27; 13.4.). Um dennoch zwischen diesen in den Transformationspopulationen möglicherweise auftretenden Varianzen (verursacht durch Transformation eines Vektors in *D. discoideum*) und *Silencing* durch ein RNA *hairpin* zu unterscheiden, wurde nur bei einer Reduktion der CadA Expression von deutlich über 50% von RNA-vermitteltem *Silencing* ausgegangen.

9.6.5. Analyse von pDM326 *cadA hairpin* III / IV in RdRP Deletionsstämmen

Eine genauere Charakterisierung des RNAi Mechanismus sollte durch Analyse von Transformanten der Konstrukte *cadA hairpin* III und IV erfolgen. Bei diesen wurde im Vergleich zu *hairpin* II der doppelsträngige Bereich auf ca. 200 bp am 5' Ende von *cadA* reduziert und mit *sense*; *loop*, *antisense* wurde zudem die Fragmentreihenfolge im Vektor invertiert. *Hairpin* III und IV unterscheiden sich nur darin, dass bei *hairpin* III das *sense* Fragment mit dem ATG Startcodon von *cadA* beginnt und dieses bei *hairpin* IV entfernt wurde. Die in Abbildung 9.26. für *cadA hairpin* III und in Abbildung 13.4. im Anhang für *cadA hairpin* IV aufgeführten Analysen wurden analog zum *cadA hairpin* II durchgeführt.

Hierbei konnte in keinem der untersuchten RdRP Deletionsstämme und im *drnB* Deletionsstamm eine signifikante Reduktion von *cadA* mRNA oder der Proteinmenge festgestellt werden. Durch die verwendete OLB Sonde siRNAs II wurden im doppelsträngigen Bereich von *hairpin* III und *hairpin* IV siRNAs in allen untersuchten Stämmen nachgewiesen. Die Intensität der erhaltenen Signale war deutlich schwächer als bei *hairpin* II, jedoch konnte aufgrund der unterschiedlichen Positionen der *hairpin* Konstrukte kein direkter Vergleich der siRNA Mengen erfolgen. Zusammenfassend wurden in den durchgeführten Analysen keine Unterschiede zwischen *hairpin* III und IV festgestellt und im Gegensatz zu *hairpin* II konnte mit den verkleinerten *hairpin* Konstrukten kein *Silencing* von *cadA* durch RNAi ausgelöst werden, obwohl der RNA *hairpin* zu siRNAs prozessiert wurde.

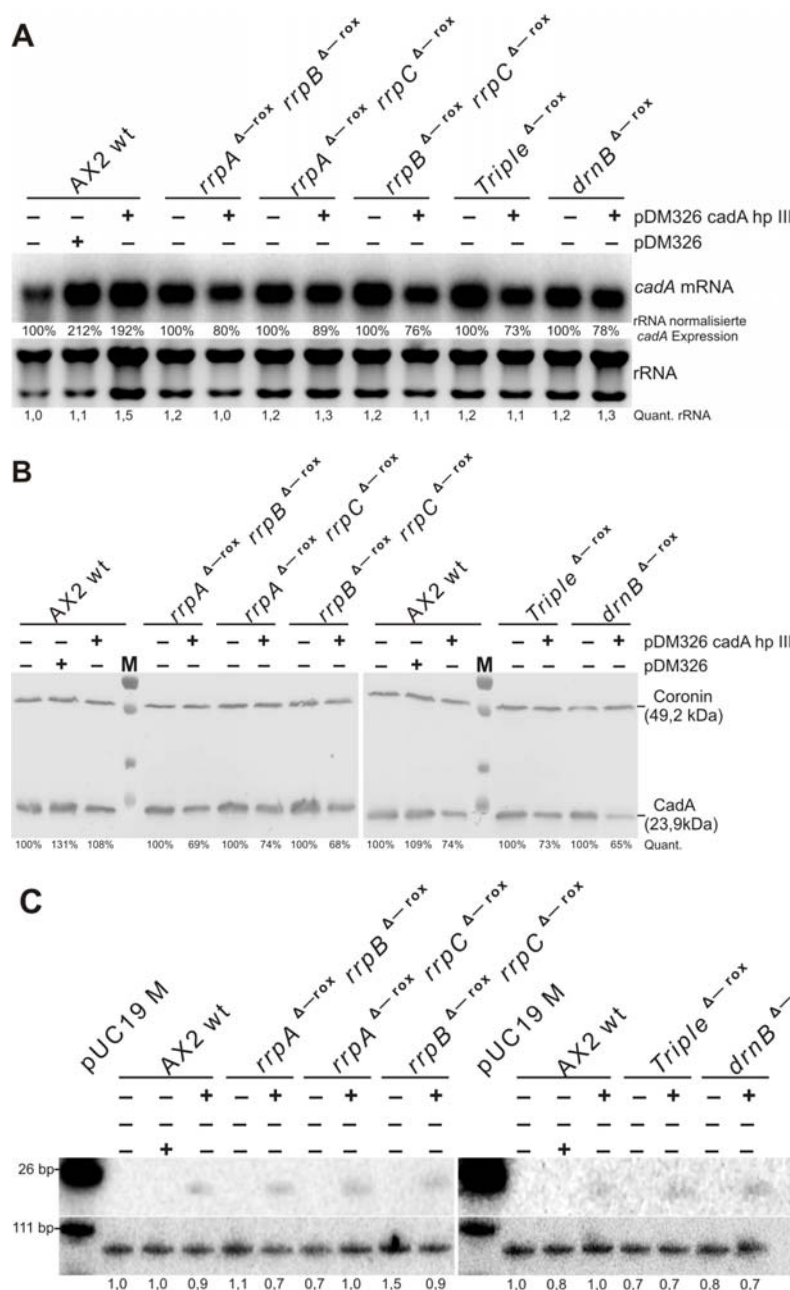


Abb. 9.26.: Analyse von *cadA* nach Transformation von pDM326 *cadA* hairpin III in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen.

A: Northern Blot zum Nachweis von *cadA* mRNA in den angegebenen Stämmen mit Hilfe der OLB Sonde *cadA* mRNA. Die Normalisierung der *cadA* mRNA erfolgte relativ zur rRNA Menge des jeweiligen Stamms.

B: Western Blot zum semiquantitativen Nachweis von CadA und Coronin als Transferkontrolle. Die Quantifizierung der CadA Proteinmenge erfolgte jeweils relativ zum untransformierten RdRP Deletionsstamm. M bezeichnet den verwendeten Größenstandard (#SM1811 Fermentas).

C: Northern Blot zum Nachweis von *cadA* siRNAs mit der OLB Sonde siRNAs II nach chemischen Crosslinking. Lademengen und Transfereffizienzen wurden über DdR-6 RNA überprüft. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas).

9.6.6. Analyse von pDM326 *cadA* antisense und sense in RdRP Deletionsstämmen

Antisense RNA kommt in *D. discoideum* natürlicherweise vor (Hildebrandt and Nellen, 1992). Um zu untersuchen, ob ein *antisense* Effekt auch künstlich ausgelöst werden kann, wurden eine zum kodierenden Bereich von *cadA* vollständig komplementäre RNA mit Hilfe des Vektors pDM326 unter Blasticidin-Selektion in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen exprimiert. Die in Abbildung 9.27. zusammengefassten Daten zeigen, dass in RdRP Deletionsstämmen durch Expression der *antisense* RNA keine signifikante Reduktion der *cadA* mRNA oder der Proteinmenge ausgelöst wird.

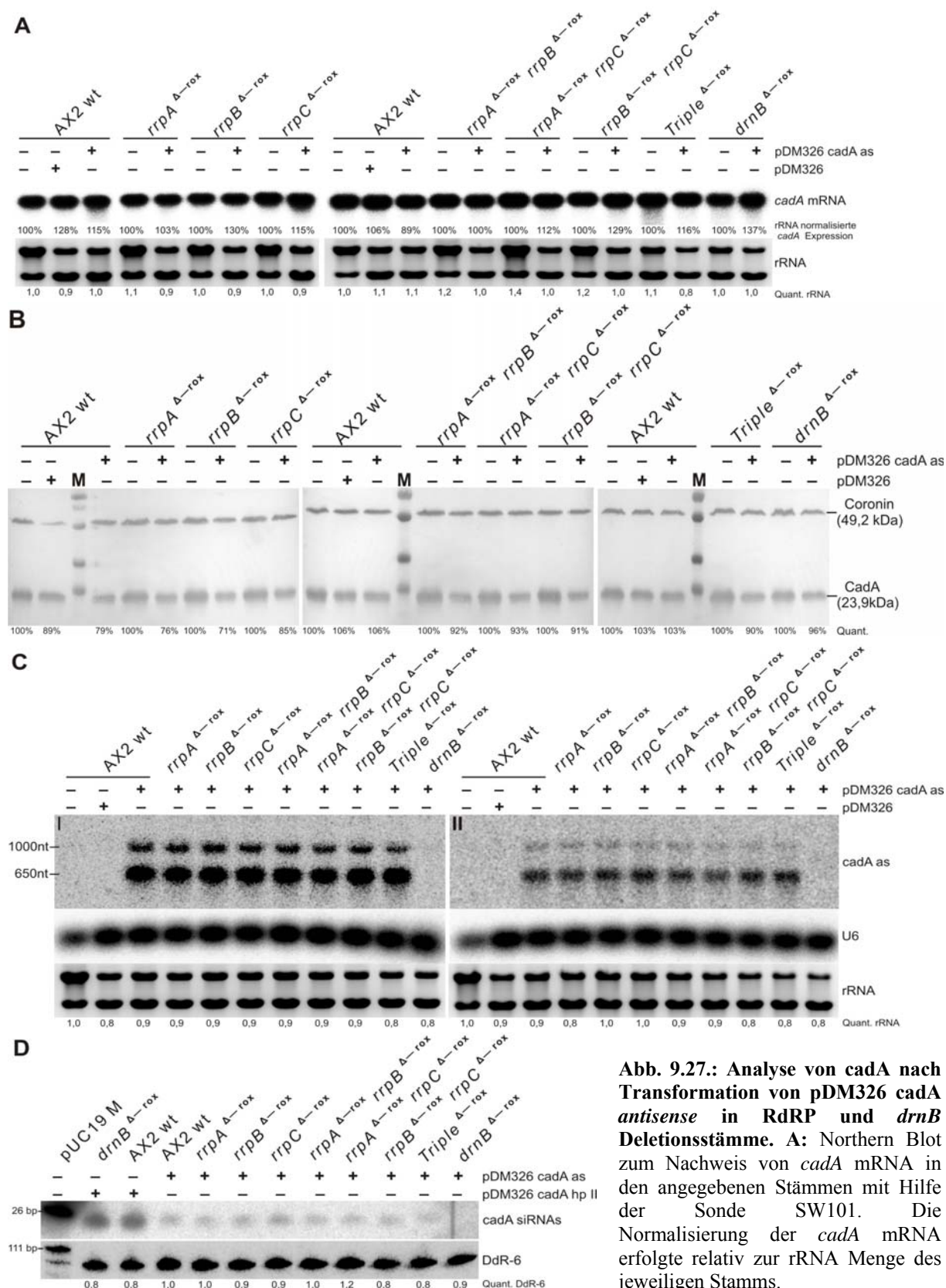


Abb. 9.27.: Analyse von *cadA* nach Transformation von pDM326 *cadA antisense* in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen. A: Northern Blot zum Nachweis von *cadA* mRNA in den angegebenen Stämmen mit Hilfe der Sonde SW101. Die Normalisierung der *cadA* mRNA erfolgte relativ zur rRNA Menge des jeweiligen Stamms.

B: Northern Blot zum Nachweis von *cadA antisense* RNA mit der Sonde SW102 (I) und SW103 (II). Nachweis von U6 RNA diente als Lade- und Transferkontrolle. **C:** Western Blot zum semiquantitativen Nachweis von CadA und Coronin als Transferkontrolle. Die Quantifizierung der CadA Proteinmenge erfolgte jeweils relativ zum untransformierten RdRP Deletionsstamm. M bezeichnet den verwendeten Größenstandard (#SM1811 Fermentas). **D:** Northern Blot zum Nachweis von *cadA* siRNAs mit der OLB Sonde siRNAs I nach chemischen Crosslinking. Lademengen und Transfereffizienzen wurden über DdR-6 RNA überprüft. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas).

Die *antisense* RNA, ist in AX2 wt und in allen RdRP Deletionsstämmen in Volllänge von ca. 650 nt exprimiert, wie zwei unabhängige Northern Blots zeigen (vgl. Abb. 9.27. C). Außerdem wurde ein zweites unerwartetes Transkript mit einer Länge von ca. 1000 nt nachgewiesen. Zusätzlich konnten in AX2 wt und den untersuchten RdRP Deletionsstämmen *cadA* siRNAs nachgewiesen werden. Die hierfür verwendete OLB Sonde siRNAs I deckt einen ca. 500 nt großen Bereich der *cadA* Sequenz ab. Im direkten Vergleich zu siRNAs, welche aus der Expression von *cadA* *hairpin* II resultieren, ist die durch die *antisense* RNA induzierte siRNA Menge deutlich geringer (vgl. Abb 9.27. D). Da für *drnB*^{Δ-rox} weder *antisense* RNA noch *cadA* siRNAs nachgewiesen wurden, ist anzunehmen, dass in diesem Fall keine Expression des *cadA antisense* Konstrukts erfolgte.

Um zu untersuchen, ob in *D. discoideum* auch Co-Suppression zu beobachten ist, wurde eine *cadA sense* RNA ohne ATG Startcodon mit dem Vektor pDM326 (Blasticidin-Selektionsmarker) exprimiert. Nach Transformation in RdRP und *drnB* Deletionsstämme wurden auch hier die bereits für die *hairpin* Konstrukte beschriebenen Analysen durchgeführt. Die in Abbildung 9.28. zusammengefassten Daten zeigen keine durch Expression der *cadA sense* RNA verursachte signifikante Änderungen der CadA Expression.

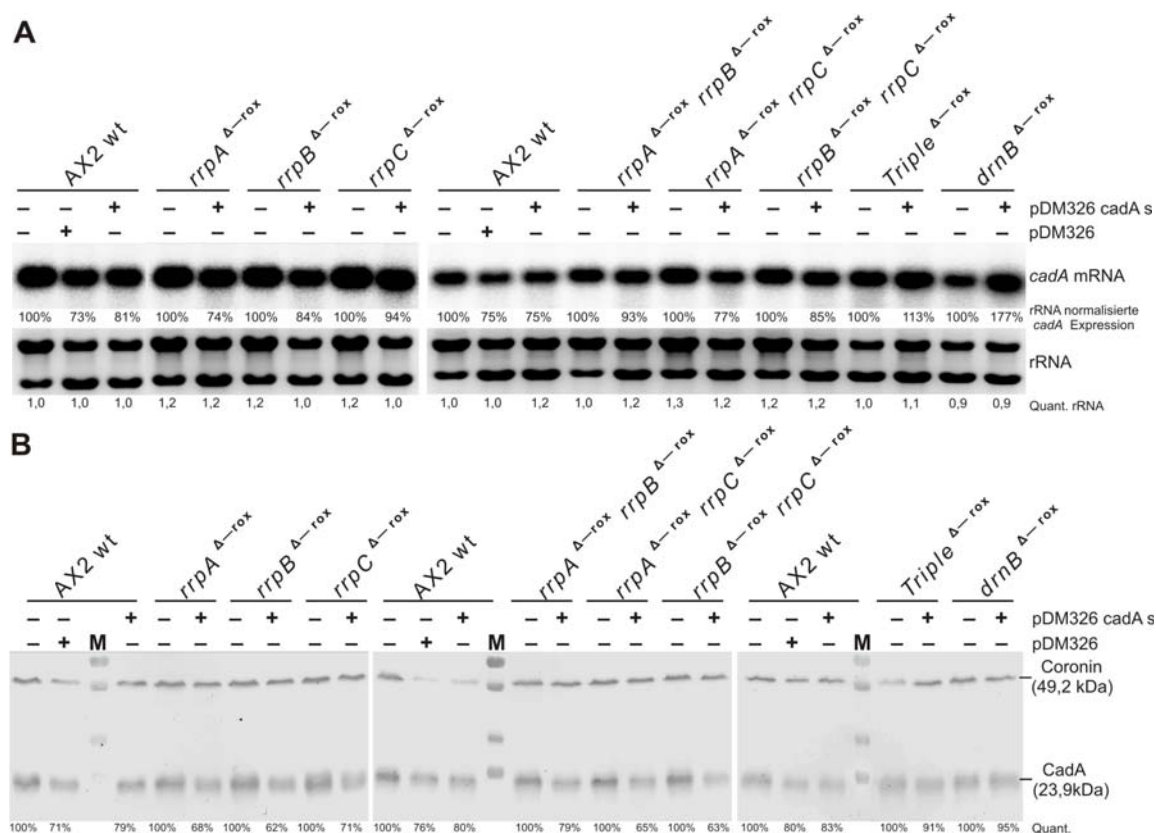


Abb. 9.28.: Analyse von *cadA* nach Transformation von pDM326 *cadA sense* in RdRP und *drnB* Deletionsstämme. **A:** Northern Blot zum Nachweis von *cadA* mRNA in den angegebenen Stämmen mit Hilfe der Sonde SW101. Die Normalisierung der *cadA* mRNA erfolgte relativ zur rRNA Menge des jeweiligen Stamms. **B:** Western Blot zum semiquantitativen Nachweis von CadA und Coronin als Transferkontrolle. Die Quantifizierung der CadA Proteinmenge erfolgte jeweils relativ zum untransformierten Deletionsstamm. M bezeichnet den verwendeten Größenstandard (#SM1811 Fermentas).

9.6.7. Zusammenfassung der mit dem CadA Reportersystem erzielten Ergebnisse

Zur Analyse des RNAi Mechanismus in *D. discoideum* wurde das CadA Reportersystem entwickelt. Damit kann die Menge des Endogens *cadA* durch Transkription von extrachromosomalen *cadA Silencing* Konstrukten, unter Geneticin- und Blasticidin-Selektion post-transkriptionell, reduziert werden (zusammengefasst in Tab. 9.15.). Nur mit dem Konstrukt *cadA hairpin II* ließ sich die *cadA* Menge reduzieren: bei Nutzung des Vektors pDM 304 unter Geneticin Selektion um ca. 50% und mit dem Vektor pDM326 *cadA hairpin II* unter Blasticidin-Selektion um mindestens 70%. Mit den Vektoren pDM326 *hairpin III* und IV konnte kein *Silencing* ausgelöst werden, jedoch wurden *cadA* siRNAs nachgewiesen. Die Expression von *sense* und *antisense* RNA führte zu keiner signifikanten Änderung der *cadA* Menge, obwohl bei Expression der *antisense* RNA entstehende *cadA* siRNAs detektiert wurden. Alle RdRP Deletionsstämme verhielten sich hierbei wie AX2 wt. Hervorzuheben ist, dass im *drnB* Deletionsstamm bei Expression des *hairpin II* Konstrukts keine Reduktion der CadA Proteinmenge nachgewiesen wurde, obwohl die mRNA Menge deutlich reduziert war.

Tabelle. 9. 15.: Zusammenfassung CadA Reportersystem.

Vektor	cadA	AX2 wt	RdRP Deletionsstämme			<i>drnB</i> Δ - <i>rox</i>
			<i>single</i> KOs	<i>double</i> KOs	<i>triple</i> KO	
pDM326 <i>cadA sense</i>	mRNA Protein		keine signifikante Veränderung detektierbar			
pDM 326 <i>cadA antisense</i>	mRNA Protein siRNAs as RNA	+ +++	+ +++	+ +++	+ +++	k.A. ^b
pDM304 <i>cadA hp II</i>	mRNA Protein siRNAs	– 50% – 50% ++	– 50% – 50% ++	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
pDM326 <i>cadA hp II</i>	mRNA Protein siRNAs	– 70 bis 90% – 70 bis 95% +++	– 70 bis 90% – 70 bis 95% +++	– 70 bis 90% – 70 bis 95% +++	– 70 bis 90% – 70 bis 95% +++	– 70 bis 90% wt Niveau +++
pDM326 <i>cadA hp III</i> / pDM 326 <i>cadA hp IV</i>	mRNA Protein siRNAs	+ +	+ +	+ +	+ +	+

Anzahl der Kreuze symbolisiert nachgewiesene siRNA Mengen.

^a n. d. = nicht durchgeführte Analysen in RdRP *double*, *triple* und *drnB* Deletionsstämmen.

^b k.A. = keine Angaben möglich, da nicht nachweisbar.

9.7. Das β -Gal Reportersystem

9.7.1. Konzeption und Etablierung des β -Gal Reportersystems

Mit der Entwicklung des β -Gal Reportersystems sollte ein zweites unabhängiges System zur Analyse des RNAi Mechanismus in RdRP Deletionsstämmen geschaffen werden. Anstatt eines endogenen Zielgens wie beim CadA Reportersystem, wurde ein heterologes Reportersystem basierend auf dem Transgen *lacZ* aus *E. coli* entwickelt. Die ektopische Expression von *lacZ* in *D. discoideum* unter der Kontrolle von endogenen Promotoren und Terminatoren wurde bereits für zahlreiche zell- und molekularbiologische Studien verwendet (Dingermann et al., 1989). In diesen Studien zeigte β -Gal keine biologischen Nebeneffekte wie z.B. ungewollte phänotypische Veränderungen. Zusätzlich und im Gegensatz zum semiquantitativen CadA Reportersystem kann die Aktivität von β -Gal in *D. discoideum* quantitativ im ONPG Assay nachgewiesen werden (Dingermann et al., 1990).

Dieses heterologe Reportersystem erfordert die Expression von Transgen und β -gal *Silencing* Konstrukt von zwei getrennten Vektoren mit unterschiedlichen Selektionsmarkern. Bezüglich der Stabilität der Expression von *lacZ* in *D. discoideum* waren nur unzureichende Informationen verfügbar. Da jedoch eine stabile Expression essentiell für die Funktionalität des Reportersystems ist, wurde diese in Vorversuchen genauer analysiert. Hierzu wurde zunächst der Vektor pD *lacZ* unter Blasticidin-Selektion in AX2 wt transformiert, welcher in einer oder mehreren Kopien in das Genom integriert und somit eine relativ schwache Expression im Vergleich zu integrierenden Vektoren unter Geneticin Selektion liefert (Pang et al., 1999). Die nachfolgende Einzelklonanalyse im ONPG Assay zeigte eine stabile β -Gal Aktivität. Die ermittelten Aktivitätsunterschiede bei Kultur in Petrischale bzw. Schüttelkultur, wurden auf die geringere Aktivität des verwendeten *actin* Promotors in Schüttelkultur zurückgeführt (Nellen et al., 1984). β -Gal Aktivität konnte in den Einzelklonen auch nach der Reaktivierung von Sporen nachgewiesen werden. Die hierbei beobachteten Aktivitätsunterschiede können durch während der Entwicklung auftretende epigenetische Effekte erklärt werden (vgl. Abb. 13.5. A-D im Anhang). Zur Expression von β -gal *Silencing* Konstrukten kann ein zweiter integrierender Vektor oder ein extrachromosomaler Vektor unter Geneticin Selektion verwendet werden. Um mögliche Wechselwirkungen zwischen den beiden Vektoren des β -Gal Reportersystems genauer untersuchen zu können, wurden in den zuvor etablierten β -Gal Expressionsstamm (AX2 pD *lacZ*) der Vektor pDneo2a GFP (integrierend) bzw. pTX GFP (extrachromosomal) transformiert. Die Analyse der Gesamtpopulation im ONPG Assay nach Transformation des zweiten Vektors (pDneo2a GFP

bzw. pTX GFP), zeigte in beiden Fällen keine signifikanten Unterschiede in der β -Gal Aktivität (vgl. Abb. 13.5. E im Anhang). Die nachfolgend durchgeführte Einzelklonanalyse dieser Transformationspopulationen ergab, dass durch die Anwesenheit eines zweiten Vektors die Expression von *lacZ* (vom ersten Vektor) aktiviert aber auch inhibiert werden kann (vgl. Tab. 13.6. im Anhang). Zusätzlich durchgeführte Western Blots zum Nachweis der GFP Expression in diesen Einzelklonen, zeigten im Vergleich zur Transformationen der gleichen Vektoren in AX2 wt keine signifikanten Veränderungen der GFP Expression, verursacht durch den β -Gal exprimierenden Vektor (Daten nicht gezeigt).

In den Vorversuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von β -Gal und GFP zumindest in den Transformationspopulationen konstant bleibt, was die Konzeption eines heterologen Reportersystems ermöglicht. Zur Expression des Transgens wurden die integrierenden Vektoren pD *lacZ* (schwache β -Gal Expression unter Blasticidin-Selektion; Reportersystem I) und pDneo2a *lacZ* (starke β -Gal Expression unter Geneticin Selektion; Reportersystem II) erstellt (vgl. Abb. 9.29. D). Diese beiden Vektoren waren notwendig, da im Vorfeld nicht analysiert werden konnte, bei welcher Expressionsstärke des Transgens ein möglichst effizientes *Silencing* ausgelöst werden kann. Zur Expression von β -gal *Silencing* Konstrukten wurden wieder extrachromosomale Vektoren der pDM Serie (Veltman et al., 2009a) mit Blasticidin-Resistenz für Reportersystem I und Geneticin-Resistenz für Reportersystem II verwendet (vgl. Abb. 9.29. D – F). Gründe hierfür waren, dass diese bei geringen Klon zu Klon Varianzen eine starke Expression der Konstrukte ermöglichen und hohe Transformationseffizienzen mit großen Einzelklonausbeute, liefern.

Die für das β -Gal Reportersystem erstellten *Silencing* Konstrukte sind in Abbildung 9.29. A schematisch dargestellt. Zur Untersuchung von RNAi in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen wurde auch hier ein β -gal *hairpin* Konstrukt erstellt. Um möglicherweise auftretendes 5' bzw. 3' *spreading* untersuchen zu können, wurde der 500 bp lange doppelsträngige Bereich des *hairpins* in der Mitte der kodierenden Sequenz von *lacZ* positioniert. Zur Unterscheidung zwischen siRNAs, welche aus der Prozessierung des *hairpins* resultieren und solchen die über mögliches *spreading* entstehen, wurde bei diesem Konstrukt eine Teilsequenz von GFP als *loop* Bereich verwendet. Auch ermöglicht dies die Untersuchung einer möglichen Prozessierung des *loop* Bereichs. Analog zum CadA Reportersystem wurden Konstrukte zur Expression einer *antisense* RNA bzw *sense* RNA erstellt, mit denen analysiert werden sollte, ob *antisense* Effekte oder Co-Suppression auftreten (Details zur Konzeption vgl. Abb. 9.29.).

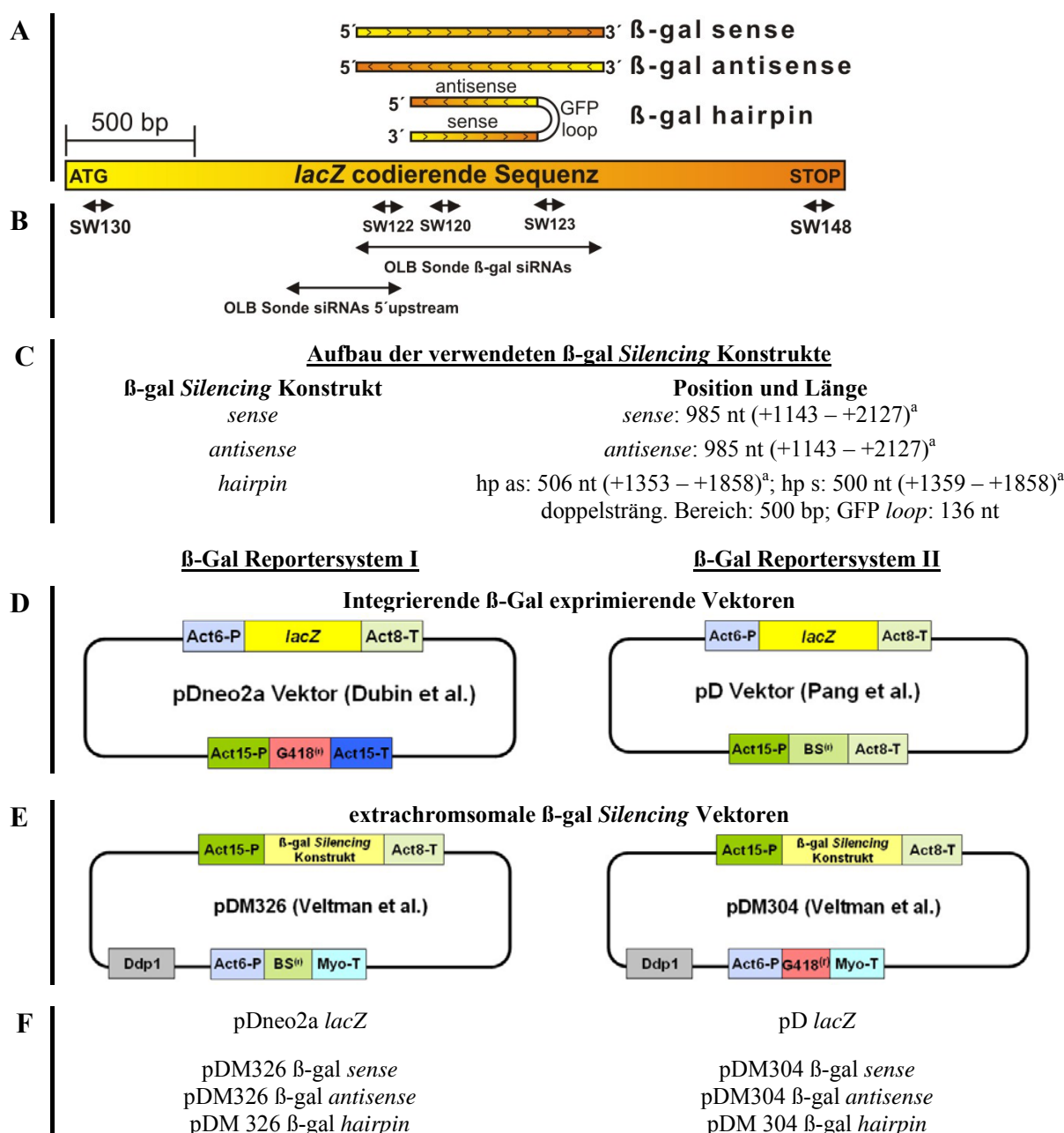


Abb. 9.29.: Konzeption des β-Gal Reportersystems. **A:** Schematische, maßstabsgetreue Darstellung der verwendeten β-gal Silencing Konstrukte. **B:** Positionen der eingesetzten Sonden zum Nachweis von *lacZ* mRNA (Oligonukleotid SW130, SW148), siRNAs (Oligonukleotid SW120, OLB Sonde β-gal siRNAs, OLB Sonde siRNAs 5' upstream) und antisense RNA (Oligonukleotide SW122, SW123). **C:** Details zum Aufbau der verwendeten β-gal Silencing Konstrukte. ^a Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Startcodon der kodierenden Sequenz von *lacZ*. **D:** β-Gal Reportersystem I und II mit den zur Expression von *lacZ* verwendeten integrierenden Vektoren pDneo2a *lacZ* (Geneticin-Resistenz) bzw. pD *lacZ* (Blasticidin-Resistenz). **E:** Verwendete extrachromosomale Vektoren zur Expression von β-gal Silencing Konstrukten unter Blasiticidin-Resistenz (pDM326) für β-Gal Reportersystem I bzw. Geneticin-Resistenz (pDM304) für β-Gal Reportersystem II. Ddp1 bezeichnet den Locus, welcher für die Replikation von extrachromosomalen Vektoren in *D. discoideum* notwendig ist. **F:** Übersicht über die hergestellten Vektoren des β-Gal Reportersystem (Klonierungsstrategie und Vektorkarten vgl. 13.1.6. und 13.1.7.).

Zunächst konnte unter Verwendung des Vektors pDneo2a *lacZ* ein stark exprimierender Stamm für AX2 wt generiert werden. Nachfolgend wurden das β-gal *hairpin* Konstrukt und zur Kontrolle der leere Vektor pDM326 in vier biologischen Replikaten in diesen Stamm

transformiert. Da in den Vorversuchen festgestellt wurde, dass die Transformation eines zweiten Vektors die Aktivität von β -Gal beeinflusst, wurden diese auf die Messwerte des selben Stamms mit leerem Vektor normiert. Die Expression des *hairpin* Konstrukts verursachte eine Reduktion der β -Gal Aktivität zwischen 65% und 80% (vgl. Abb. 13.7. im Anhang). Auch wurde in Northern Blots zum Nachweis des β -gal *hairpins* und von β -gal siRNAs eine vollständige Prozessierung des *hairpins* zu siRNAs nachgewiesen (vgl. 13.6. A im Anhang). Northern Analysen zum Nachweis der *lacZ* mRNA, zeigten, dass diese relativ instabil ist und zahlreiche Degradationsprodukte verschiedener Längen den Nachweis erschwerten. Die Instabilität der *lacZ* mRNA wurde auch in anderen Arbeitsgruppen beobachtet (persönliche Mitteilung W. Nellen, Abt. Genetik, Universität Kassel). Durch Einsatz von Oligonukleotid Sonden am 5' bzw. am 3' Ende der kodierenden Sequenz von *lacZ* konnten dennoch spezifische Nachweise erfolgen. (vgl. Abb. 13.6.). Da in diesen ersten Experimenten die Funktionalität des β -Gal Reportersystems I nachgewiesen werden konnte, erfolgten die im Folgenden aufgeführten Analysen mit diesem Vektorsystem. Das alternativ erstellte Reportersystem II wurde für keine weiteren Analysen eingesetzt.

In Abbildung 9.30. sind die in den RdRP und *drnB* Deletionsstämmen gemessenen β -Gal Aktivitäten zusammengefasst. Die größten Varianzen der β -Gal Aktivität, traten auch hier zwischen Messungen direkt nach Transformation und Messungen nach Reaktivierung der hergestellten Sporen des jeweiligen Stamms auf. Da jedoch für die durchgeführten Analysen nur β -Gal Expressionsstämmen nach erfolgter Sporulation eingesetzt wurden, beeinflussen diese Varianzen die Aussagekraft des Reportersystems nicht. Die durch Transformation des leeren Vektors pDM326 verursachten Varianzen der β -Gal Aktivität, konnten durch die beschriebene Strategie bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

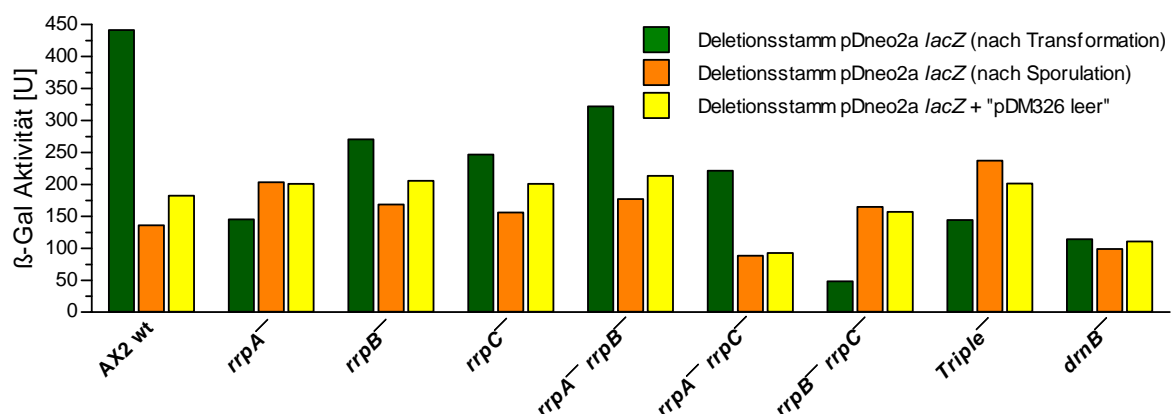


Abb. 9.30.: β -Gal Aktivität in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen. Die Messungen der β -Gal Aktivität mittels ONPG Assay wurden direkt nach Transformation des Vektors pDneo2a *lacZ*, nach Sporulation der Expressionsstämmen und nach Transformation des leeren Vektors pDM326 in die Expressionsstämmen durchgeführt ($U / \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Gesamtprotein).

9.7.2. Analyse von pDM326 β -gal *hairpin* in RdRP Deletionsstämmen

Nach Transformation des Vektors pDM326 β -gal *hairpin* in die zuvor erstellten β -Gal exprimierenden RdRP und *drnB* Deletionsstämmen wurde die β -Gal Aktivität untersucht. Diese war in allen Stämmen durch die Expression der β -gal *hairpin* RNA um mindestens 50% reduziert (vgl. Abb. 9.31.). Die *lacZ* mRNA Menge wurde in Northern Blot Analysen als variabel beobachtet, jedoch nicht abhängig von der Anwesenheit des *hairpin* Konstrukts. Die Varianzen sind vermutlich auf die geringe Stabilität der *lacZ* mRNA in *D. discoideum* und den dadurch erschwerten Nachweis zurückzuführen.

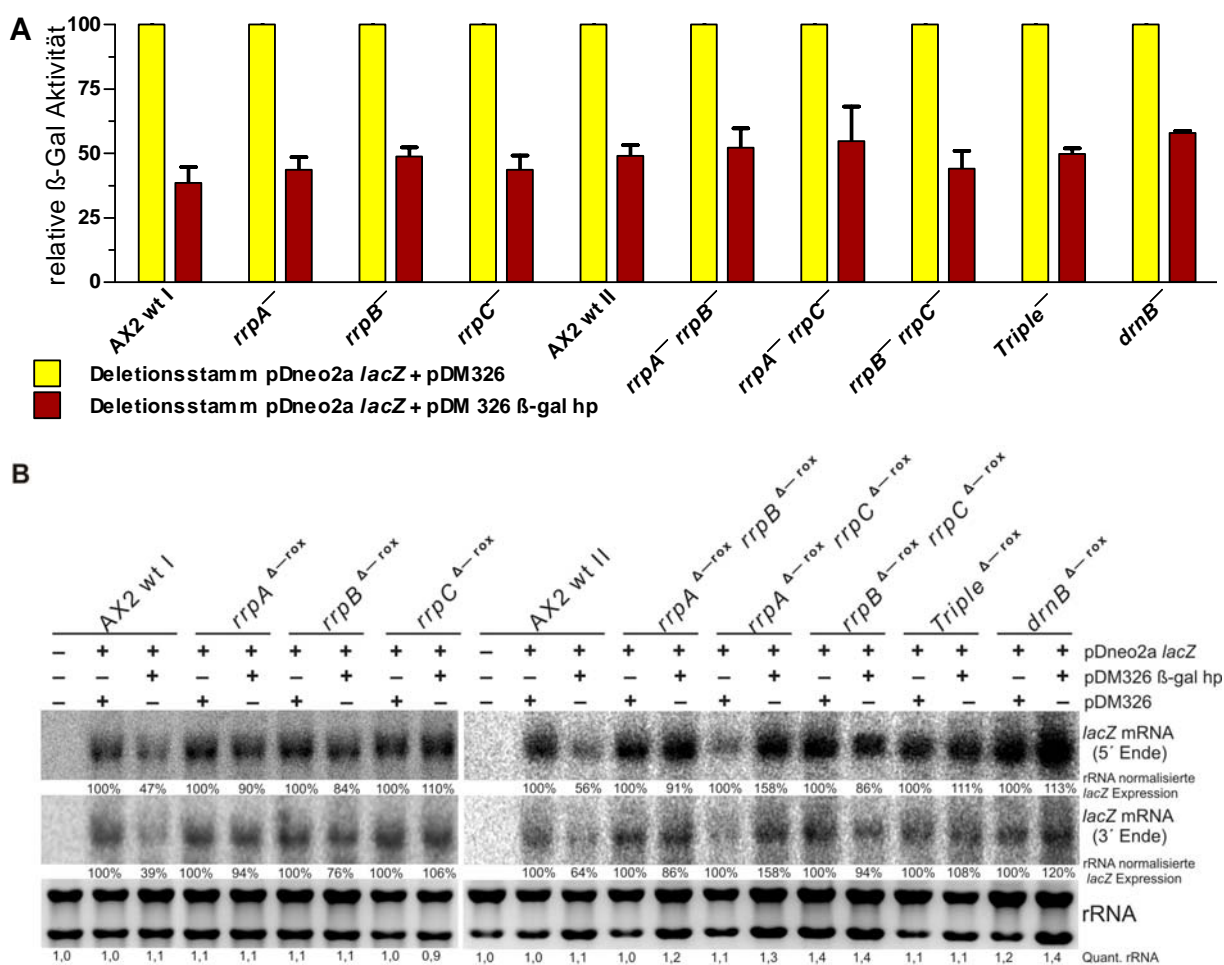


Abb. 9.31.: Analyse des Effekts von pDM326 β -gal *hairpin* in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen.

AX2 wt I und II bezeichnet biologische Replikate. **A:** ONPG Assay zur Bestimmung der β -Gal Aktivität nach Normierung auf die Werte nach der Transformation des leeren Vektors pDM326 in den jeweiligen β -Gal exprimierenden Deletionsstamm. Die Werte aus drei technischen Replikaten sind gemittelt und Standardabweichungen sind als Balken dargestellt. **B:** Northern Blot zum Nachweis von *lacZ* mRNA am 5' Ende bzw. 3' Ende der kodierenden Sequenz mit den Sonden SW130 und SW148. Die Normalisierung der *lacZ* mRNA erfolgte relativ zur rRNA Menge in den jeweiligen β -Gal exprimierenden Deletionsstamm und in Bezug auf die Expression nach Transformation des leeren Vektors pDM326.

In Northern Blots mit Sonde SW120 im doppelsträngigen Bereich des β -gal *hairpin* Konstrukts wurden siRNAs in allen untersuchten β -Gal exprimierenden Stämmen in ähnlichen Mengen nachgewiesen (Abb. 9.32. A). Auch in den mit Vektor pDM326 β -gal

hairpin transformierten RdRP und *drnB* Deletionsstämmen, die das Transgen nicht exprimierten, wurden siRNAs, welche aus der Prozessierung des *hairpins* resultierten, nachgewiesen. In diesen vergleichenden Studien konnten keine signifikanten Mengenunterschiede, zwischen den jeweiligen Stämmen mit und ohne Transgen, festgestellt werden. (vgl. Abb. 9.32. A).

Zum Nachweis von 5' *spreading* wurde die OLB Sonde siRNAs 5' *upstream* verwendet, welche 24 nt vor dem 5' Ende des eingesetzten *hairpin* Konstrukt positioniert wurde (vgl. Abb. 9.32. B). Dies ermöglicht die Unterscheidung von siRNAs, welche aus der Prozessierung der *hairpin* RNA resultieren und siRNAs, welche durch 5' *spreading* entstehen. Die in Abbildung 9.32. B dargestellten Northern Blots zeigen, dass 5' *spreading* in AX2 wt und allen RdRP Deletionsstämmen in denen *rrpC* bzw. *drnB* nicht deletiert wurde, nachgewiesen werden konnte. Für *drnB*^{Δ-rox} und in allen *rrpC* Deletionsstämmen wurde kein 5' *spreading* nachgewiesen.

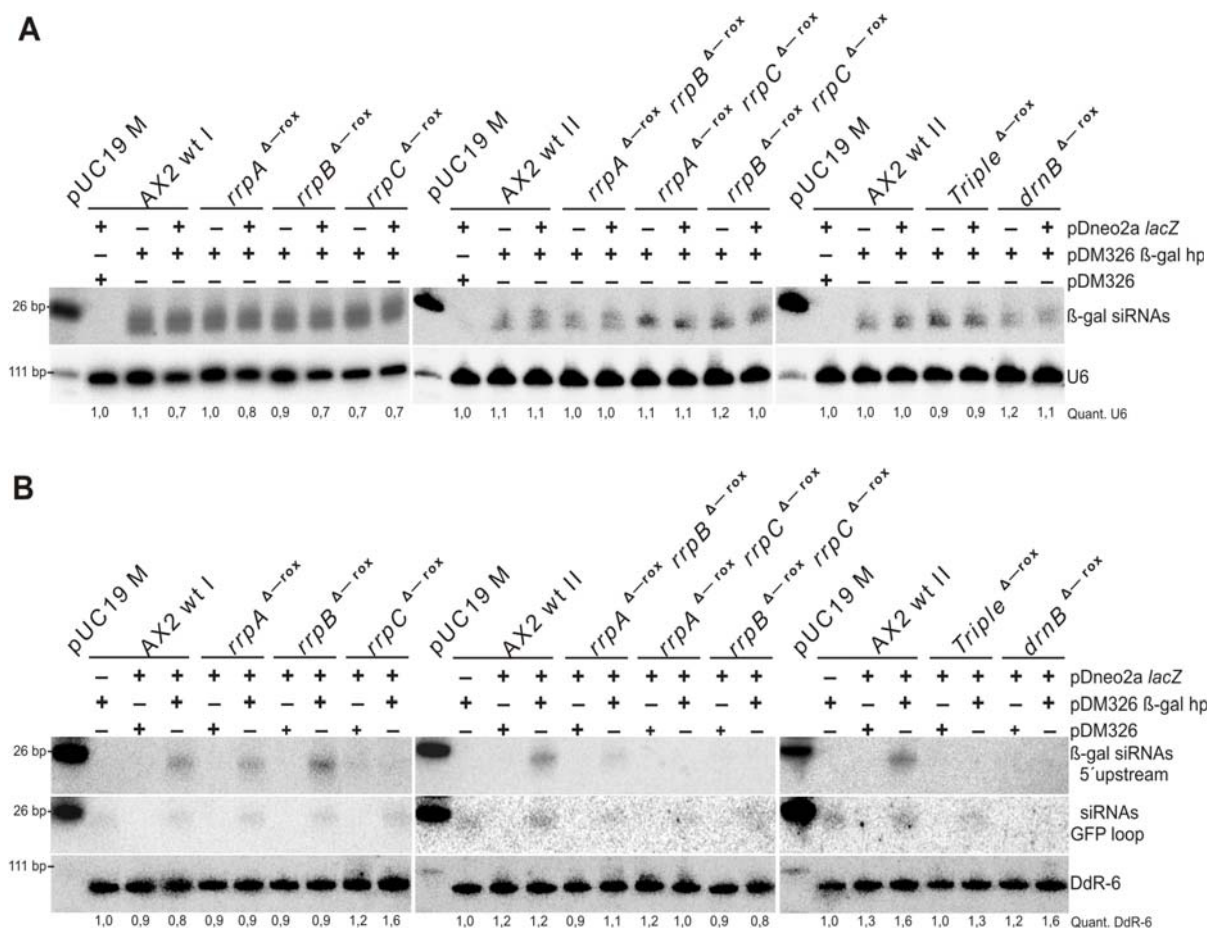


Abb.9.32.: Northern Blots zum Nachweis von β -gal siRNAs in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen.

AX2 wt I und II bezeichnet biologische Replikate. **A:** Nachweis von β -gal siRNAs in den angegebenen Stämmen mit der Sonde SW120 nach UV-Crosslinking. Lademengen und Transfereffizienzen wurde über U6 RNA überprüft. **B:** Nachweis von 5' *spreading* (Sonde siRNAs *upstream*) und siRNAs, welche aus der Prozessierung des GFP loops resultieren (Sonde siRNAs GFP loop). Lademengen und Transfereffizienzen wurde über DdR-6 RNA überprüft. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas).

Abschließend sollte eine mögliche Prozessierung des *loop* Bereichs im β -gal *hairpin* Konstrukt analysiert werden. Unabhängig vom Verhandensein des *lacZ* Transgens, wurden *loop* siRNAs in AX2 und in allen β -Gal exprimierenden RdRP Deletionsstämmen detektiert, jedoch nicht in *drnB* ^{Δ -rox} (vgl. Abb. 9.32. B). Ein Nachweis dieser siRNAs konnte nur durch Einsatz einer 136 nt langen OLB Sonde, welche den gesamten *loop* abdeckte, erfolgen. Oligo Sonden hingegen lieferten keine spezifischen Signale.

9.7.3. Analyse von pDM326 β -gal *sense* und *antisense* in RdRP Deletionsstämmen

Zur Untersuchung möglicher *antisense* Effekte und von Co-Suppression wurden die Vektoren pDM326 β -gal *antisense* bzw. pDM326 β -gal *sense* in die β -Gal exprimierenden RdRP und *drnB* Deletionsstämme transformiert. Die anschließende Analyse der Transformationspopulationen wurde auch hier, wie für das *hairpin* Konstrukt beschrieben, durchgeführt.

Die in Abbildung 9.33. A dargestellte Analyse der β -Gal Aktivität zeigt, dass die Expression der β -gal *sense* RNA keine signifikante Änderung in den untersuchten Stämmen verursacht. Die Expression der *antisense* RNA hingegen führte in allen Stämmen zur Reduktion der β -Gal Aktivität um mindestens 50%. Keiner der mit *antisense* bzw. *sense* Konstrukt transformierten β -Gal exprimierenden Stämme zeigte in den Northern Blots eine signifikante Änderung der *lacZ* mRNA Menge (9.30. B und C). Die ermittelten Varianzen wurden auch hier auf die geringe Stabilität der *lacZ* mRNA zurückgeführt.

Zur genaueren Analyse des beobachteten *antisense* Effekts wurde zunächst versucht die exprimierte β -gal *antisense* RNA in Northern Blots nachzuweisen. Trotz Einsatz zweier verschiedener Oligonukleotid Sonden (SW122 und SW123) konnte diese nicht detektiert werden. Interessanterweise konnten jedoch deutliche Signale für β -gal siRNAs in *rrpC* ^{Δ -rox} und in allen RdRP *double* Deletionsstämmen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 9.33. D). Ein Vergleich nach Expression der *hairpin* und der *antisense* RNA ergab, dass durch die *antisense* RNA wesentlich geringere Mengen β -gal siRNAs generiert wurden. (vgl. Abb. 13.8. im Anhang).

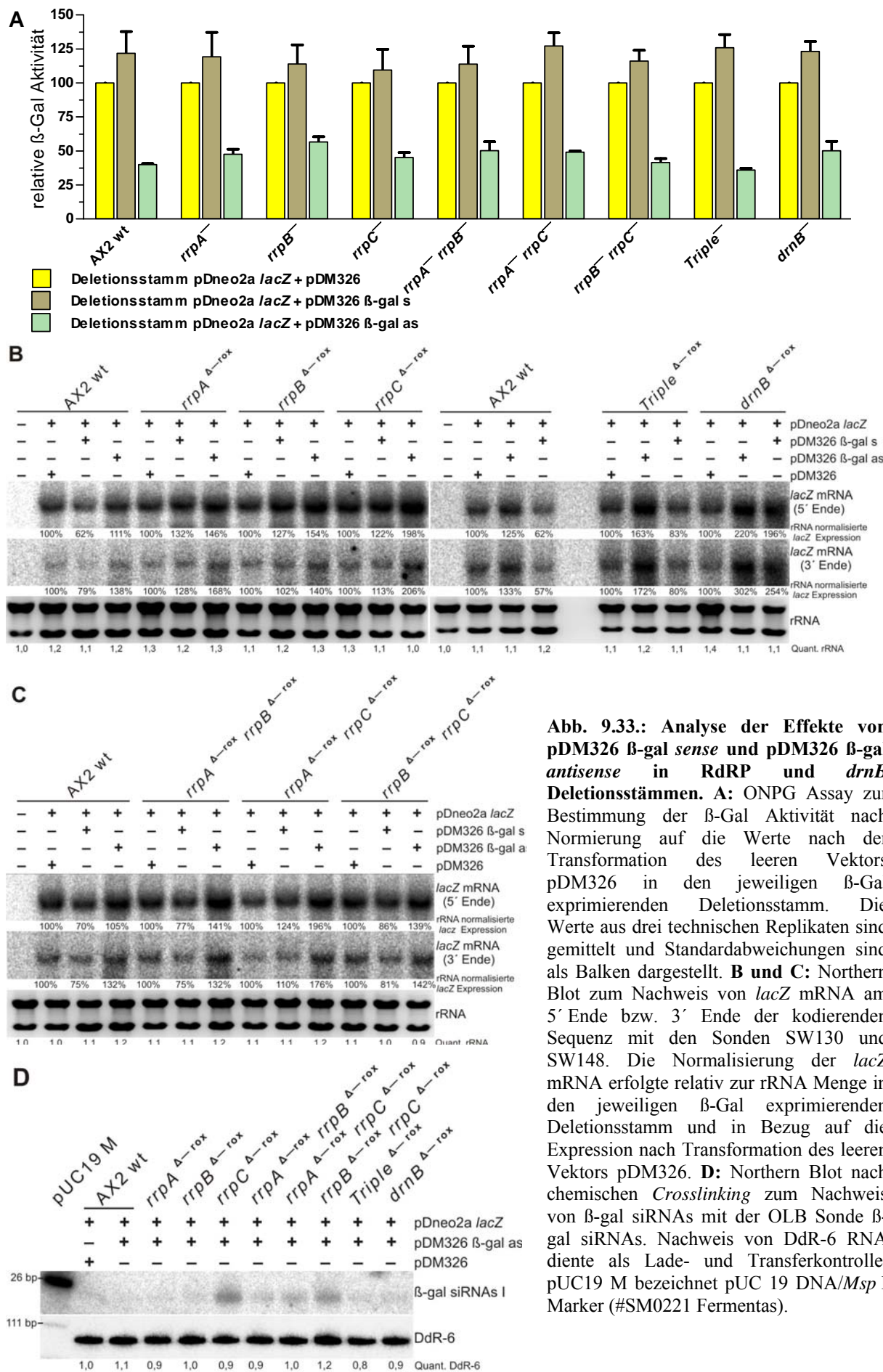


Abb. 9.33.: Analyse der Effekte von pDM326 β -gal sense und pDM326 β -gal antisense in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen. **A:** ONPG Assay zur Bestimmung der β -Gal Aktivität nach Normierung auf die Werte nach der Transformation des leeren Vektors pDM326 in den jeweiligen β -Gal exprimierenden Deletionsstamm. Die Werte aus drei technischen Replikaten sind gemittelt und Standardabweichungen sind als Balken dargestellt. **B und C:** Northern Blot zum Nachweis von *lacZ* mRNA am 5' Ende bzw. 3' Ende der kodierenden Sequenz mit den Sonden SW130 und SW148. Die Normalisierung der *lacZ* mRNA erfolgte relativ zur rRNA Menge in den jeweiligen β -Gal exprimierenden Deletionsstamm und in Bezug auf die Expression nach Transformation des leeren Vektors pDM326. **D:** Northern Blot nach chemischen *Crosslinking* zum Nachweis von β -gal siRNAs mit der OLB Sonde β -gal siRNAs. Nachweis von DdR-6 RNA diente als Lade- und Transferkontrolle. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas).

9.7.4. Zusammenfassung der mit dem β -Gal Reportersystem erzielten Ergebnisse

Mit dem β -Gal Reportersystem wurde ein heterologes Reportersystem zur Untersuchung von RNA-vermittelten Mechanismen der Genregulation in *D. discoideum* etabliert. Die Expression des Transgens *lacZ* und die nachfolgende Expression von sequenzhomologen β -gal *Silencing* Konstrukten erfolgte hierbei von zwei getrennten Vektoren mit unterschiedlichen Selektionsmarkern. Die mit diesem Reportersystem für RdRP und *drnB* Deletionsstämme durchgeführten Analysen sind in Tabelle 9.16. zusammengefasst. Die β -Gal Aktivität konnte durch Expression einer *hairpin* RNA aber auch durch Expression einer *antisense* RNA in allen untersuchten Stämmen um mindestens 50% reduziert werden. Eine entsprechende Reduktion der *lacZ* mRNA konnte jedoch in beiden Fällen nicht festgestellt werden. Nachweise von siRNAs nach Expression der β -gal *hairpin* RNA, zeigten eine vollständige Prozessierung des *hairpins* zu siRNAs. Nur in Stämmen, in denen *rrpC* oder *drnB* nicht deletiert waren, wurde *spreading* von β -gal siRNAs 5' zur Position der *hairpin* RNA beobachtet. Die Expression einer verkürzten β -gal *sense* RNA verursachte auch bei diesem Reportersystem keine Veränderung in der β -Gal Aktivität.

Tabelle. 9. 16.: Zusammenfassung der mit dem β -Gal Reportersystem erhaltenen Daten.

Vektor	β-gal	β-Gal Expressionstamm (pDneo2a <i>lacZ</i>)									
		AX2 wt	RdRP Deletionsstämme								<i>drnB</i> [−]
			<i>single</i> KOs			<i>double</i> KOs			<i>triple</i> KO		
			A [−]	B [−]	C [−]	A [−] B [−]	A [−] C [−]	B [−] C [−]			
pDM326 β-gal <i>sense</i>	mRNA Protein		keine signifikante Veränderung detektierbar								
pDM 326 β-gal <i>antisense</i>	mRNA Protein		keine signifikante Veränderung detektierbar β-Gal Aktivität um mindestens 50% reduziert								
	siRNAs as RNA	k.A.	k.A.	k.A.	+	+	+	+	k.A.	k.A.	
pDM326 β-gal <i>hairpin</i>		nicht nachweisbar									
	mRNA Protein		keine signifikante Veränderung detektierbar β-Gal Aktivität um mindestens 50% reduziert								
	siRNAs (im hp Bereich)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	<i>5' spreading</i>	++	++	++	k.A.	++	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	

Anzahl der Kreuze symbolisiert nachgewiesene siRNA Mengen.

k.A. =keine Angaben möglich, da nicht nachweisbar.

10. Diskussion

10.1. RdRPs in *D. discoideum*

Zellulär kodierte RNA abhängige RNA Polymerasen wurden als essentielle Komponente des RNAi Mechanismus in zahlreichen Organismen identifiziert (zusammengefasst in Maida and Masutomi, 2011). Hierbei synthetisieren sie anhand einer RNA Matrize die entsprechenden komplementären sekundären siRNAs oder längere doppelsträngige RNA Moleküle. Diese können nachfolgend durch Dicer Proteine zu sekundären siRNAs prozessiert werden. Im Genom des Modellorganismus *D. discoideum* konnten die für drei RNA abhängige RNA Polymerasen kodierenden Gene *rrpA*, *rrpB* und *rrpC* identifiziert werden (Martens et al., 2002), wobei ein Sequenzvergleich der RdRP Domänen hohe Homologien zu funktionellen RdRP Domänen aus anderen Organismen zeigte (Abb. 5.4.).

10.1.1. Expressionsanalyse und Klonierung der RdRPs

Zu Beginn dieser Arbeit waren bezüglich der Expression der RdRPs in *D. discoideum* keine Informationen verfügbar. Durch qRT-PCR Analysen konnte eine schwache Expression aller drei Gene in vegetativen Zellen nachgewiesen werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass es sich nicht um Pseudogene handelt, obwohl die genomischen Sequenzen von *rrpA* und *rrpB* nahezu identisch sind. Auch wurde während der Entwicklung ein schwacher Anstieg der Expression für alle drei Gene beobachtet (vgl. Abb. 9.2.). Die relativ hohen Varianzen der Messwerte können auf geringste Integritätsunterschiede in der aufgerinigten RNA (Fleige and Pfaffl, 2006) und Effizienzunterschiede in der reversen Transkription (Stahlberg et al., 2004a; Stahlberg et al., 2004b) zurückgeführt werden. Diese Varianzen schließen weiterführende Aussagen bezüglich der Expression der RdRPs während der Entwicklung von *D. discoideum* aus. Die nachfolgend veröffentlichten *RNA-seq* Daten (Rot et al., 2009) bestätigen jedoch, die sowohl in vegetativen Zellen, als auch während der Entwicklung ermittelte sehr schwache aber nachweisbare Expression aller drei Gene. So wurde z.B. für *rrpC* in vegetativen Zellen ein Wert von 2,4 *scaled reads counts* ermittelt. Dies bedeutet, dass pro 1 Million *reads* der *RNA-seq* Analyse pro kB kodierende Sequenz von *rrpC* durchschnittlich 2,4 *reads* nachgewiesen wurden. Interessanterweise zeigt ein Vergleich der *RNA-seq* Daten für alle bisher identifizierten Komponenten des RNAi Mechanismus in *D. discoideum*, wie RdRP, Argonauten und Dicer-ähnliche Proteine, eine ähnlich schwache Expression (vgl. Abb. 10.1.).

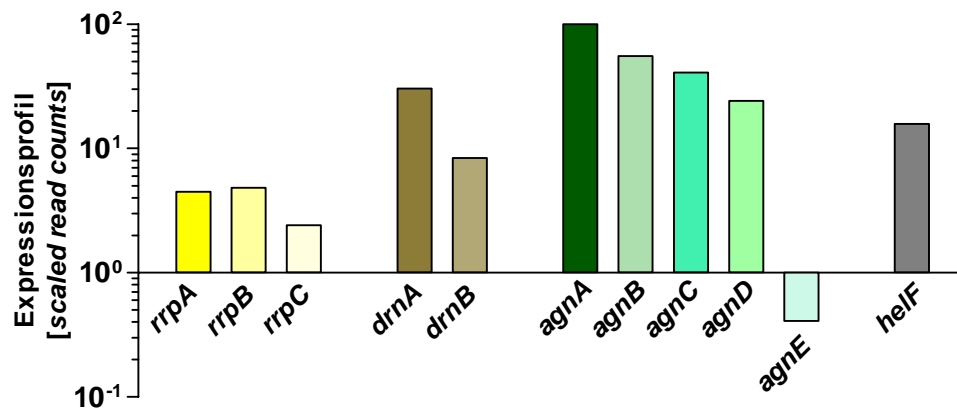


Abb. 10.1.: RNA-seq Expressionsprofil von Komponenten des RNAi Mechanismus in *D. discoideum*. Abbildung beinhaltet Expressionprofil in vegetativen Zellen für RdRP Homologe (*rrpA*, *rrpB*, *rrpC*), Dicer-ähnliche Proteine (*drnA*, *drnB*), Argonauten Homologe (*agnA* – *agnE*) und für die putative Helicase *hefF*. RNA-seq Daten wurden von der Genexpressionsdatenbank für *D. discoideum dictyExpress*, welche mittels *deep RNA sequencing* erstellt wurde, unverändert übernommen (*scaled read counts* = *deep sequencing reads* normalisiert auf *reads* pro 1 Million und pro 1 kB Gensequenz) (vgl. <http://www.ailab.si/dictyExpress>).

Die kodierenden Sequenzen der RdRPs konnten ohne Mutationen, welche die Expression beeinflussen würden, in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert werden. Die nachfolgende Umklonierung in einen Zielvektor der pDneo2a Serie (Dubin and Nellen, 2010), zur Erstellung von Überexpressionszelllinien in *D. discoideum*, war jedoch nicht möglich. Sehr wahrscheinlich kann dies auf die Größen der Inserts (ca. 7 kB) und der resultierenden Expressionsvektoren (ca. 14 kB) zurückgeführt werden, woraus deutlich reduzierte Ligationseffizienzen resultieren (Sambrook, 2001). Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass eine ligationsunabhängige Klonierung der RdRP Gene durch Verwendung des StarGate[®]-combinatorial cloning Systems der Firma IBA in den Akzeptorvektor pXSG-IBA176-dicty erfolgreich war (persönliche Mitteilung M. Malicki, AG Ribogenetics, TU Darmstadt).

10.1.2. RdRP knock out Stämme und das Discoidin Reportersystem

In den zuerst erstellten RdRP *knock out* Stämmen ohne vollständige Deletion von Helicase und RdRP Domäne konnten die korrekte Integration der *knock out* Konstrukte durch homologe Rekombination in die genomische Sequenz der RdRPs durch PCR und Southern Analysen gezeigt werden (vgl. Abb. 9.6.). Unerwarteterweise wurden jedoch in zusätzlichen RT-PCR Analysen der *knock out* Stämme Transkripte am 3' Ende der kodierenden Sequenzen der RdRPs nachgewiesen. Eine Hypothese, welche die RdRP spezifischen Transkripte am 3' Ende trotz korrekter Integration der *knock out* Konstrukte erklären könnte, basiert auf den spezifischen Eigenschaften von Terminatoren in *D. discoideum* und den darin enthaltenen

3' Prozessierungssignal (AATAAA Signal flankiert durch A/T-reiche Regionen). In Studien zur Charakterisierung von Terminatoren konnte nachgewiesen werden, dass diese auf weiter *downstream* gelegene Promotoren aktivierend wirken können (Maniak and Nellen, 1991). Daher besteht die Möglichkeit, dass der im *knock out* Konstrukt enthaltene Actin-8 Terminator auf endogene kryptische Promotoren innerhalb der Sequenz der RdRPs aktivierend wirkt, was zu den nachgewiesenen Transkripten am 3' Ende führen könnte. Durch Einführung der im *knock out* Konstrukt enthaltenen vorzeitigen Stopp Codons sollten eigentlich entstehende Transkripte in dem als *Nonsense-mediated decay* bezeichneten Signalweg abgebaut werden, wenn man davon ausgeht, dass es sich bei diesen um Transkripte der RNA Polymerase II handelt (Muhlemann et al., 2008).

Im Fall von *rrpC*^{−lox} bzw. *rrpC*^{−rox} beinhalten diese Transkripte den vollständigen kodierenden Bereich der RdRP Domäne, da in diesen Stämmen die Integration des *knock out* Konstrukts innerhalb der N-terminalen Helicase Domäne erfolgte und RdRP spezifische Transkripte am 3' Ende nachgewiesen wurden. Eine Translation dieses Transkripts würde die Anwesenheit einer internen Ribosomen Eintrittsstelle (IRES) erfordern, welche bereits in zahlreichen eukaryotischen Organismen beschrieben wurden (zusammengefasst in Mokrejs et al., 2010). In Northern Blot Analysen von *rrpC knock out* Stämmen mit und ohne BS^(r) Selektionsmarker wurden signifikante Mengenunterschiede von Skipper und DIRS-1 siRNAs festgestellt. Da der Terminator beim Entfernen des Selektionsmarkers ebenfalls entfernt wird, kann dies als indirekter Hinweis für eine Translation der Transkripte angesehen werden. In den nachfolgend neu hergestellten RdRP Deletionsstämmen wurden die RdRP und Helicase Domäne vollständig entfernt, um solche Artefakte auszuschließen.

Im Jahr 2002 wurde von H. Martens publiziert, dass *rrpA* eine essentielle Komponente des RNAi Mechanismus von *D. discoideum* ist, da die Stilllegung von Discoidin mit Hilfe einer *hairpin* RNA im *rrpA knock out* Stamm nicht mehr möglich war. Diese Aussage basierte auf der Analyse von weniger als zehn Klonen (Martens et al., 2002). Unter Verwendung des gleichen Reportersystems sollten diese Daten in den zunächst erstellten RdRP *double* und *triple knock out* Stämmen, reproduziert werden. Trotz einer sehr hohen Anzahl untersuchter Klone, wurden jedoch weder für *hairpin* RNA noch für *antisense* RNA signifikante Unterschiede zwischen AX2 wt und den untersuchten *knock out* Stämmen festgestellt, was insbesondere auch für die *rrpA*^{−lox} und *rrpA*^{−rox} Stämme gilt (vgl. Tab. 9.5. und Tab. 9.6.). Zusätzlich wurde mit dem neu entwickelten CadA Reportersystem in dem von H. Martens generierten *knock out* Stamm von *rrpA* in zwei biologischen Replikaten *Silencing* von CadA nachgewiesen (vgl. Abschnitt 9.6.3.). Darüber hinaus zeigte eine genauere Untersuchung der

Expression von Discoidin in untransformierten *knock out* Stämmen, dass das verwendete Discoidin Reportergen trotz kontrollierter Kulturbedingungen nicht konstant exprimiert wird, was die widersprüchlichen und nicht reproduzierbaren Ergebnisse erklären könnte (vgl. Abb. 9.8.). Unterstützt wird dies durch Untersuchungen der Regulation des *discoidin Iy* Promotors und der Expression von Discoidin, in denen gezeigt wurde, dass diese in einem komplexen Netzwerk durch zahlreiche intrazelluläre und extrazelluläre Faktoren (u.a. Zelldichte, Konzentration von cAMP, Folat und Ammoniumionen) reguliert werden (Blusch et al., 1995; Wetterauer et al., 1993a; Wetterauer et al., 1995; Wetterauer et al., 1993b). Nach Transformation von Discoidin *Silencing* Konstrukten, Selektion und nachfolgende Subklonierung können diese Faktoren die Expression von Discoidin trotz standardisierter Kulturbedingungen beeinflussen. Daher können beobachtbare Veränderungen der Expression nicht eindeutig der Anwesenheit von *Silencing* Konstrukten zugeordnet werden.

Zusammenfassend legt dies den Schluss nahe, dass Discoidin als Reportergen zur Analyse des RNAi Mechanismus ungeeignet ist, daher wurden die CadA und β -Gal Reportersysteme entwickelt.

10.2. RdRP Deletionsstämme

10.2.1. Herstellung von RdRP Deletionsstämmen mittels pKOSG System

Mit dem entwickelten pKOSG System können Gendeletionsvektoren für *D. discoideum* sehr schnell und effizient erstellt werden. Gegenüber einer konventionellen Klonierungsstrategie können mit diesem System sowohl Zeitaufwand als auch anfallende Kosten deutlich reduziert werden. Insgesamt konnten zur Validierung des pKOSG Systems 16 Vektoren im ersten Ansatz erfolgreich erstellt werden, wobei die Ausbeute positiver Klone für die Hälfte über 90% lag (Wiegand et al., 2011). Prinzipiell könnte ein Ein-Schritt-Klonierungssystem für Gendeletionsvektoren auch mit anderen Klonierungssystemen wie z.B. Gateway (Walhout et al., 2000) oder Red/ET (Zhang et al., 1998) erstellt werden, wenn mit diesen zwei PCR-Produkte gleichzeitig in ein Akzeptor System integriert werden können. *Cre-loxP* basierte Klonierungssysteme wie z.B. In-Fusion (Marsischky and LaBaer, 2004) können hingegen nicht verwendet werden, da hier die Entfernung des Selektionsmarkers nach erfolgreicher Deletion eines Gens in *D. discoideum* nicht mehr möglich wäre. Die Vorteile des StarGate[®]-*combinatorial cloning* Systems der Firma IBA sind neben der hohen Effizienz während der Plasmidherstellung relativ kurze *combinatorial sites*, mit denen die genspezifischen

Primersequenzen ergänzt werden (vgl. Tab. 9.7.). Dies ist besonders wichtig für den Modellorganismus *D. discoideum*, mit einem außerordentlich hohen A/T Gehalt des Genoms von 77,57% (Eichinger et al., 2005), da mit diesem System überlange Primer vermindert werden, welche PCR-Reaktionen negativ beeinflussen können. Das pKOSG System kann prinzipiell auch auf andere Organismen, in welchen längere homologe Sequenzabschnitte für die Erstellung von Gendeletionen durch homologe Rekombination benötigt werden, angepasst werden.

Konstrukte, welche mittels pKOSG System generiert wurden, unterscheiden sich von solchen die mittels konventioneller Klonierung in den pLPBLP Vektor erstellt wurden, nur in den zusätzlich vorhandenen Sequenzen der *combinatorial sites* CS2 und CS3 (vgl. Abb. 9.9. E). Diese zusätzlichen Sequenzen beeinflussen die Funktionalität des Konstrukts jedoch nicht, da keine signifikanten Unterschiede in den Effizienzen der Gendeletion und bei der Entfernung des BS^(r) Selektionsmarkers, festgestellt wurden (vgl. Abschnitt 9.4.2.). Auftretende Unterschiede können auf ungleiche Transformationseffizienzen zurückgeführt werden, da diese in *D. discoideum* zwischen 10^2 und 10^5 Transformaten pro μg transformierte DNA variieren kann (zusammengefasst in Gaudet et al., 2007).

Zusammenfassend ermöglicht das entwickelte pKOSG System die Herstellung von Gendeletionsvektoren für *D. discoideum*. Aufgrund des reduzierten Zeit- und Materialaufwands stellt es eine deutliche Verbesserung gegenüber konventioneller Klonierung dar, bei gleichbleibender Funktionalität der hergestellten *knock out* Konstrukte.

10.2.2. RdRP Deletionstämme

Mit Hilfe der über das pKOSG System generierten Vektoren konnten RdRP *single*, *double* und *triple* Deletionsstämme in allen möglichen Kombinationen hergestellt werden. Demnach sind die *rrp* Gene nicht essentiell in *D. discoideum*. Auch traten in diesen Deletionsstämmen keine deutlichen phänotypischen Veränderungen auf. Interessanterweise wurden auch in *knock out* Stämmen von anderen Genen des RNAi Mechanismus in *D. discoideum* bisher keine phänotypischen Veränderungen beobachtet (persönliche Mitteilung F. Söderbom, W. Nellen). Fehlende phänotypische Veränderungen nach *knock out* von Genen sind jedoch keine seltene Beobachtung. Genomweite Analysen in *S. cerevisiae* zum Beispiel zeigten, dass bei 5700 mutierten *single-copy* Genen bei 40% bis 77% keine phänotypischen Veränderungen auftraten (Gu et al., 2003; Wagner, 2000). Ähnliche Studien wurden für *A. thaliana* (Bouche and Bouchez, 2001) und *C. elegans* (Conant and Wagner, 2004) veröffentlicht. In diesen werden als mögliche Ursachen unter anderem funktionelle Redundanz, genetische

Duplikationen, kompensierende genetische Netzwerke oder geringe Stressbedingungen unter Laborkonditionen diskutiert. Die beobachteten Varianzen in der Verdoppelungszeit in *rrpC* Deletionsstämmen bei axenischem Wachstum, welche stark schwankten und in biologischen Replikaten nicht eindeutig reproduziert werden konnten, könnten darauf hindeuten, dass auch in RdRP Deletionsstämmen mögliche phänotypische Änderungen nur unter geeigneten Stressbedingungen auftreten.

Trotz sehr hoher Sequenzidentität zwischen *rrpA* und *rrpB* und den daraus resultierenden fast identischen Bereichen für homologe Rekombination, konnten mit den jeweiligen *knock out* Konstrukten ausschließlich *rrpA* oder *rrpB* deletiert werden. Dies legt den Schluss nahe, dass homologe Rekombination in *D. discoideum* ein sehr stringent verlaufender Prozess ist, was auch durch die relativ langen benötigten Bereiche für homologe Rekombination unterstützt wird. Diese hohe Spezifität des Mechanismus wurde sowohl in Prokaryoten (Shen and Huang, 1986) als auch bei Eukaryoten (te Riele et al., 1992) festgestellt, wobei wahrscheinlich DNA-*Mismatch* bzw. Fehlpaarungs-Reparatursysteme ursächlich für diese Spezifität sind, da diese Rekombination zwischen homologen, jedoch nicht sequenzidentischen DNA Abschnitten, unterdrücken (Rayssiguier et al., 1989; Selva et al., 1995).

10.3. Veränderungen endogener RNAs in RdRP Deletionsstämmen

Das kompakte Genom von *D. discoideum* besteht zu 10% aus komplexen repetitiven Elementen (Glockner et al., 2001). Ungehinderte Mobilität dieser springenden genetischen Elemente würde zum Verlust der Integrität und zur Destabilisierung des Genoms führen. Um dies zu verhindern werden die entsprechenden Sequenzen durch verschiedene Mechanismen stillgelegt. Erste mechanistische Studien in *D. discoideum* zeigten für die LTR Retrotransposons DIRS-1 und Skipper, das sowohl DNA-Methylierung als auch RNAi Mechanismen involviert sind (Hinas et al., 2007; Kuhlmann et al., 2005). Mit den RdRP Deletionsstämmen sollte in dieser Arbeit die Beteiligung von Komponenten des RNAi Mechanismus an der Stilllegung der Retrotransposons genauer untersucht werden.

Aus den durchgeführten Untersuchungen von DIRS-1 spezifischen siRNAs und von längeren Transkripten in RdRP Deletionsstämmen kann ein mechanistisches Modell (vgl. Abb.10.2.) der post-transkriptionellen Stilllegung von DIRS-1 abgeleitet werden, in dem RrpC eine essentielle Funktion besitzt. In Northern Blot Analysen konnten ein ca. 4500 nt langes *sense* und ein ca. 4000 nt langes *antisense* Transkript von DIRS-1 nachgewiesen werden (vgl Abb.

9.15.). Diese bidirektionale Transkription von Transposons wurde auch in anderen Organismen wie *Drosophila* oder *Neurospora* gefunden (Lankenau et al., 1994; Sewell and Kinsey, 1996). Hierbei ist die nachgewiesene Promoteraktivität der beide LTRs von DIRS-1 (Cohen et al., 1984; Földesi, 2010; Doktorarbeit) sehr wahrscheinlich ursächlich für diese bidirektionale Transkription. Zusätzlich kürzere Transkripte heterogener Länge, die vor allem in *sense* Orientierung auftreten, resultieren möglicherweise aus den zahlreichen im Genom vorhanden Fragmenten von DIRS-1. Die *sense* und *antisense* Transkripte könnten nachfolgend einen Doppelstrang bilden, welcher durch die Aktivität eines Dicer-ähnlichen Proteins (DrnA oder DrnB) in primäre siRNAs prozessiert werden kann. Dass eine solche Prozessierung von bidirektionalen Transkripten in geringem Umfang in *D. discoideum* zur Bildung von siRNAs führen kann, konnte sowohl in *in vitro* Studien (Novotny et al., 2001), als auch mit Hilfe des CadA Reportersystems *in vivo* nachgewiesen werden, da auch hier nach Expression einer *cadA antisense* RNA siRNAs gefunden wurden (vgl. Abb. 9.27. D). RdRP-unabhängige DIRS-1 spezifische siRNAs wurden in geringer Menge im RdRP *triple* Deletionsstamm gefunden, was ihre Einstufung als primäre siRNAs zulässt (vgl. Abb. 9.16. A). In allen *rrpC* Deletionsstämmen konnte eine Akkumulation vor allem von *sense* Transkripten heterogener Länge aber auch in Volllänge bei gleichzeitig deutlich reduzierten Mengen von DIRS-1 siRNAs nachgewiesen werden (vgl. Abb. 9.15. – 9.17.). Dies legt den Schluss nahe, dass ausgehend von den primären siRNAs eine *de novo* Synthese von sekundären siRNAs durch RrpC erfolgt. Die so entstehenden großen Mengen von DIRS-1 spezifischen siRNAs führen dann zum Abbau von DIRS-1 Transkripten. Demnach resultiert die Akkumulation von längeren DIRS-1 Transkripten in Abwesenheit von RrpC nicht aus einer erhöhten Transkription des Retrotransposons, sondern auf einer verminderten Degradation dieser Transkripte. Ein weiteres Indiz für dieses Modell ist, dass die im Bereich der LTRs lokalisierten DIRS-1 siRNAs nicht durch die Deletion von *rrpC* beeinflusst werden (vgl. Abb. 9.17. Rechteck I). Mechanistisch könnte die Assoziation von DIRS-1 spezifischen siRNAs an Argonauten Proteine und weitere Proteinkomponenten den Abbau der DIRS-1 Transkripte vermitteln. Diese Effektorkomplexe, wie RISC (Hammond et al., 2000) wurden jedoch in *D. discoideum* bisher noch nicht identifiziert. Da in humanen Zelllinien siRNAs und Komponenten der RNAi Maschinerie in *P-bodies* nachgewiesen wurden (Jagannath and Wood, 2009; Jakymiw et al., 2005), ist eine durch DIRS-1 und assoziierte Proteine vermittelte Translokation von DIRS-1 Transkripten in *P-bodies* denkbar, obgleich auch diese in *Dictyostelium* noch nicht nachgewiesen wurden.

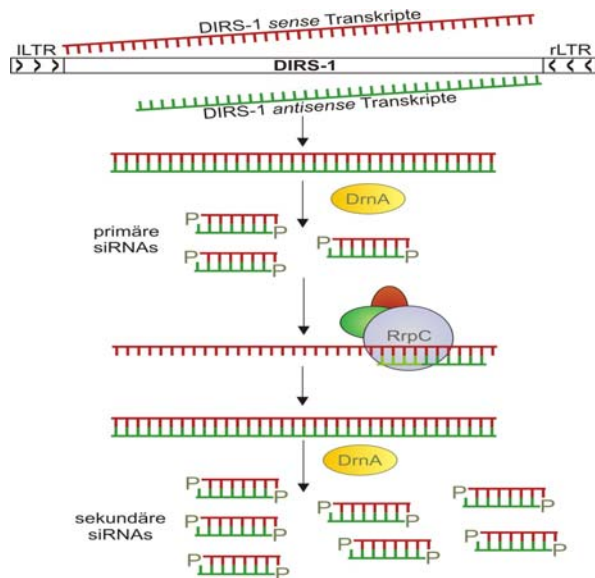


Abb. 10.2.: Modell des RNAi-vermittelten post-transkriptionellen Stilllegungsmechanismus des Retrotransposons DIRS-1. Bidirektionale DIRS-1 Transkripte, welche aus der Promotoraktivität der invertierten LTRs resultieren werden demnach zunächst durch das Dicer-ähnliche Protein DnA zu primären siRNAs prozessiert. Im Folgenden vermittelt die RdRP RrpC die Synthese von sekundären siRNAs, wobei primäre siRNAs als Primer an der DIRS-1 sense RNA fungieren. Die durch RrpC synthetisierten Doppelstränge werden wiederum durch DnA geschnitten woraus ein post-transkriptioneller Abbau der DIRS-1 sense Transkripte resultiert.

Die *de novo* Synthese von sekundären siRNAs durch RdRPs kann entweder im *guiding* Modus oder im *priming* Modus mit anschließender Prozessierung des Doppelstrangs erfolgen. Diese beiden Wege lassen sich durch die chemische Struktur des 5' Endes der entstehenden siRNAs unterscheiden (siehe Abb. 5.2.). Da die durchgeführten *deep sequencing* Analysen ohne vorherige Phosphatase Behandlung der siRNAs erfolgte, konnten hierbei nur siRNAs mit 5'-Monophosphatrest detektiert werden, da ein 5'-Triphosphatrest die Ligation der für die Sequenzierung benötigten „barcode“ Primer verhinderte. Daraus kann geschlossen werden, dass die Synthese der im *rrpC* Deletionsstamm fehlenden siRNAs (vgl. Abb. 9.17. Rechteck II und III) im *priming* Modus erfolgte. Demnach synthetisiert RrpC ausgehend von primären siRNAs, welche als Primer fungieren, längere doppelsträngige Bereiche. Diese werden nachfolgend durch ein Dicer-ähnliches Protein in sekundäre siRNAs prozessiert. Da in Abwesenheit von RrpC nach diesem Modell primäre siRNAs nicht mehr verbraucht werden, kann dies zur Akkumulation selbiger führen. Dies könnte die im *rrpC* Deletionsstamm zusätzlich gefundenen siRNAs, welche nicht in AX2 wt vorhanden waren, erklären (vgl. Abb. 9.17. Rechteck I). Im Einklang mit diesem Modell, wonach sekundäre RNAs durch RrpC im *priming* Modus synthetisiert werden, stehen die Ergebnisse der Experimente zur Charakterisierung der chemischen Struktur des 5' Endes von DIRS-1 siRNAs, da auch hier keine Hinweise auf siRNAs mit 5'-Triphosphatrest gefunden wurden (Abb. 9.16. B). Auch das mittels β -Gal Reportersystem nachgewiesene 5' *spreading* von siRNAs, welches in Abhängigkeit von RrpC und DnB erfolgte, deutet auf diese Funktionsweise von RrpC hin (vgl. Abb. 9.32. B). Da jedoch im untersuchten *drnB* Deletionsstamm keine signifikanten Mengenunterschiede von DIRS-1 spezifischen siRNAs beobachtet wurden, legt dies den Schluss nahe, dass die Prozessierung der durch RrpC synthetisierten RNA-Doppelstränge im Fall von DIRS-1 durch DnA erfolgt.

Denkbar wäre auch, dass neben primären siRNAs, zusätzlich unvollständige Doppelstränge zwischen *sense* und *antisense* Transkripten als Matritze für die Synthese längerer doppelsträngiger Bereiche durch RrpC dienen könnten. Die Auswertung der *deep sequencing* Daten zeigte für die verbleibenden siRNAs im *rrpC* Deletionsstamm unterschiedliche Verteilungsmuster (vgl. Abb. 9.17. Rechteck II und III). Dies könnte durch eine unterschiedlich effiziente Ausbildung von RNA-Doppelsträngen aus längeren DIRS-1 Transkripten zur Generierung von primären siRNAs, erklärt werden. Die *deep sequencing* Analyse zeigte im *rrpC* Deletionsstamm eine ungleichmäßige Verteilung der DIRS-1 spezifischen siRNAs zwischen *sense* und *antisense* Strang (Daten nicht gezeigt). Daher ist anzunehmen, dass zusätzlich zum beschriebenen Mechanismus siRNAs auch durch die noch intakten RdRPs RrpA bzw. RrpB synthetisiert werden. Dies könnte im *guiding* oder *priming* Modus erfolgen. Da jedoch in Northern Blots nur nach Deletion von *rrpC* signifikante Mengenunterschiede von DIRS-1 siRNAs beobachtet wurden, müssen diese Hypothesen durch zusätzliche Untersuchungen verifiziert werden.

Ähnliche RNAi-basierte Stilllegungsmechanismen für Transposons wurden auch in anderen Organismen beschrieben, wie z.B. für das LINE-1 Element in humanen Zelllinien (Yang and Kazazian, 2006), LINE, SINE Elemente, sowie LTR Retrotransposons in Maus Oocyten (Watanabe et al., 2006; Watanabe et al., 2008), das Tc1 Element in *C. elegans* (Sijen and Plasterk, 2003) oder für Transposons in somatischen Zellen von *Drosophila* (Chung et al., 2008; Ghildiyal et al., 2008). Da DIRS-1 *Cluster* im Genom von *D. discoideum* in heterochromatischen Bereichen lokalisieren und möglicherweise als Zentromere fungieren (Glockner and Heidel, 2009), könnte die hier beschriebene post-transkriptionelle Stilllegung von DIRS-1 durch RNAi auch mit der Ausbildung von Heterochromatin und mit einer transkriptionellen Stilllegung zusammenhängen. Unterstützt wird dies durch Untersuchungen der einzigen DNA Methyltransferase DnmA in *D. discoideum* (Kuhlmann et al., 2005). In diesen Studien konnte eine Methylierung der rechten LTR von DIRS-1 nachgewiesen werden. Ein Verlust dieser Methylierung im *dnmA knock out* Stamm führte aber zu keiner Akkumulation von DIRS-1 Transkripten, was auf eine ergänzende Funktion hindeuten könnte. RNAi-vermitteltes *transcriptional gene Silencing* wurde bereits in vielen Organismen untersucht (zusammengefasst in Matzke and Birchler, 2005; Moazed, 2009). Besondere Parallelen sind dabei zum RITS Komplex in *S. pombe* festzustellen, der eine RNAi-vermittelte Heterochromatisierung von Zentromer-Regionen bewirkt, was in Abhängigkeit des RdRP Homologs Rdp1 erfolgt (Motamedi et al., 2004; Sugiyama et al., 2005; Verdel et al., 2004).

Zusammenfassend konnte für das Retrotransposon DIRS-1 ein RNAi-vermittelter post-transkriptioneller Stilllegungsmechanismus aufgezeigt werden, in dem ausgehend von bidirektionalen DIRS-1 Transkripten in einem RrpC-abhängigen Mechanismus sekundäre siRNAs entstehen. Eine Deletion von RrpC in diesem Mechanismus führt zur Akkumulation von längeren DIRS-1 Transkripten und parallel zu einem massiven Verlust von sekundären siRNAs. Im Hinblick auf die von DIRS-1 gebildeten *Cluster* im Bereich der Zentromere von *D. discoideum* (Glockner and Heidel, 2009), ist eine Verbindung dieses Mechanismus zu Prozessen, die zu einer transkriptionellen Stilllegung führen, wahrscheinlich.

Überraschenderweise zeigten die durchgeführten Analysen von Skipper spezifischen siRNAs und von längeren Transkripten in RdRP Deletionsstämmen im Vergleich zu DIRS-1 ein vollständig anderes Ergebnis, wobei am auffälligsten die drastische Akkumulation von Skipper siRNAs in *rrpC* Deletionsstämmen ist. Trotz der Unterschiede zu DIRS-1 deuten die erhaltenen Ergebnisse auch hier darauf hin, dass Komponenten des RNAi Mechanismus in die Stilllegung involviert sind. Aus den verfügbaren Daten kann derzeit allerdings noch kein umfassendes mechanistisches Modell abgeleitet werden. Daher sollen im Folgenden nur einzelne mögliche Prozessierungswege vor dem Hintergrund weiterer, bereits etablierter Daten zur Stilllegung des Retrotransposons diskutiert werden. Zu diesen gehört zunächst die transkriptionelle Kontrolle von Skipper, die durch die einzige DNA Methyltransferase in *D. discoideum* DnmA vermittelt wird (Kuhlmann et al., 2005). Auch konnte am C-terminalen Ende von ORF III eine funktionelle Chromo-Domäne identifiziert werden, die als GFP-Fusionskonstrukt in einem Punkt der Kernperipherie mit Heterochromatin co-lokalisierte (Földesi, 2010; Doktorarbeit). Chromo-Domänen tragen durch Bindung an methylierte Lysine anderer Heterochromatin-Komponenten zur Bildung von Heterochromatin bei (Jacobs and Khorasanizadeh, 2002; Nielsen et al., 2002).

Unter der Vorraussetzung, dass RrpC, wie für DIRS-1 postuliert, mit primären siRNAs als Primer längere doppelsträngige Bereiche synthetisiert, würde es sich bei den in *rrpC* Deletionsstämmen akkumulierenden siRNAs um die primären siRNAs handeln, die nicht mehr verbraucht werden. Da in Abwesenheit von RrpC in den qRT-PCR Analysen keine deutliche Anreicherung von längeren Transkripten und in AX2 wt nur marginale siRNA Mengen beobachtet wurden, kann daraus geschlossen werden, dass im Wildtyp keine Prozessierung der längeren Transkripte zu sekundären siRNAs erfolgt (vgl. Abb. 9.19. und 9.20.). Demzufolge müssten die längeren Transkripte auf bisher unbekanntem Weg abgebaut werden. Eine biologische Funktion dieses Mechanismus könnte darin bestehen, einen

effizienten Abbau von Skipper Transkripten durch RNAi zu unterbinden, um Expression der Chromo-Domäne und somit Inaktivierung von Skipper durch Heterochromatin Bildung, zu ermöglichen.

Im Gegensatz zu DIRS-1 konnte für die LTRs von Skipper keine Promotoraktivität nachgewiesen werden (Földesi, 2010; Doktorarbeit). Derzeit wird davon ausgegangen, dass die Entstehung eines ca. >6000 nt langen von LTR zu LTR reichenden Skipper Transkripts, aus der Promotoraktivität eines Bereichs resultiert, welcher zwischen linkem LTR und erstem ORF lokalisiert (Leng et al., 1998). Da jedoch bisher keine Skipper *antisense* Transkripte detektiert wurden, kann die Entstehung von primären siRNAs nicht wie für DIRS-1 postuliert, auf die Bildung von RNA Doppelsträngen und deren Prozessierung zurückgeführt werden.

Als mögliche Quelle für primäre siRNAs könnten, die nur in einem Skipper Fragment auf Chromosom 2 identifizierten *hairpin* Strukturen im Bereich von ORF I fungieren. Eine von T. Winckler (Friedrich-Schiller Universität, Jena) durchgeführte genauere Analyse des Fragments zeigte, dass es vermutlich durch komplexe Rekombinationsereignisse von mindestens 2 Elementen entstanden ist, wodurch dieser Bereich Fragmente von LTR und ORF I enthält, welche zahlreiche kleinere Deletionen und Mutationen aufweisen (vgl. Abb. 10.3.). Aufgrund von Leserahmenverschiebungen wurden in diesem Bereich drei kurze ORFs (DDB_G0277765, DDB_G0277779, DDB_G0277781) identifiziert. Die Analyse zeigte darüber hinaus, dass die ca. 96 nt lange *hairpin* Sequenz dreimal in diesem Bereich enthalten ist, jedoch einmal in reverser Orientierung (siehe Abb. 10.3. B). Diese *hairpins* könnten direkt durch ein Dicer-ähnliches Protein (DrnA oder DrnB) in siRNAs prozessiert werden. Da in dem Skipper Fragment die *hairpin* Sequenz zweimal in *sense* und einmal in *antisense* Orientierung enthalten ist, können durch Rückfaltungen auch längere doppelsträngige Bereiche entstehen, welche ebenfalls prozessiert würden.

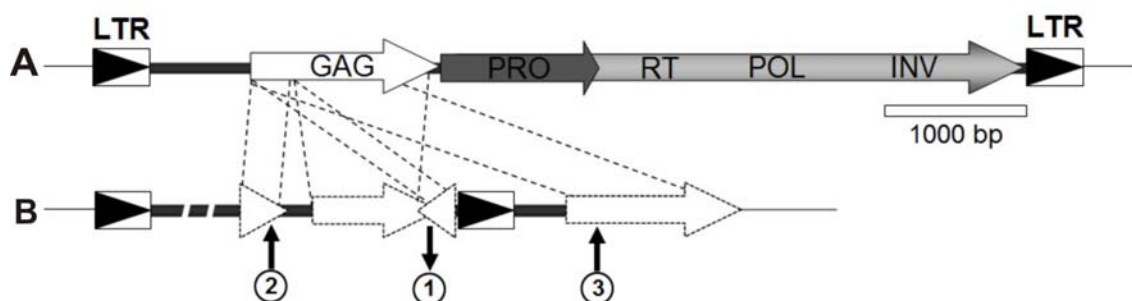


Abb. 10.3.: Schematische Darstellung des Retrotransposons Skipper und des „hairpin Bereichs“ in einem Skipper Fragment. A: Die 7 kB große genomische Sequenz des Retrotransposons Skipper, besteht aus den beiden identischen LTRs in gleicher Wiederholung und den drei zum Teil überlappenden ORFs, welche für GAG, PRO, RT, POL und INV kodieren (Details siehe Abb. 9.18.). B: „hairpin Bereich“ im Skipper Fragment auf Chromosom 2. Mögliche Rekombinationsereignisse, welche zur Entstehung dieses Skipper Fragments führten sind als gestrichelte Linien dargestellt. Positionen und Orientierung der vorhergesagten 96 nt großen *hairpin* Sequenz 1 – 3 wurden mit Pfeilen dargestellt, wobei 2 und 3 sense und 1 antisense Orientierung aufweisen. Abbildung nach T. Winckler (Friedrich-Schiller Universität, Jena), unveröffentlicht.

Im Einklang hiermit steht, dass im Bereich der *hairpin* Strukturen mittels *deep sequencing* im *rrpC* Deletionsstamm Skipper siRNAs identifiziert wurden (vgl. Abb. 9.20. erstes Rechteck). Eine solche Prozessierung von intramolekularen *hairpin* Strukturen zu siRNAs wurde auch in *Drosophila* nachgewiesen (Okamura et al., 2008b). Da die Skipper *hairpin* Strukturen nur in einer genomischen Kopie des Retroelements identifiziert wurden, müssten diese siRNAs *in trans* auch auf andere Skipper Fragmente wirken. In den durchgeführten *deep sequencing* Analysen wurden in AX2 wt keine größeren Mengen von siRNAs nachgewiesen (vgl. Abb. 9.20.). Dies könnte prinzipiell auch auf eine Primer-unabhängige *de novo* Synthese von siRNAs durch RdRPs hindeuten. Die dabei entstehenden siRNAs würden am 5' Ende ein Triphosphat aufweisen, weswegen sie in einer *deep sequencing* Analyse ohne vorherige Phosphatase Behandlung nicht detektiert würden. Dieses Szenario kann aber deswegen für Skipper ausgeschlossen werden, weil im Wildtyp keinerlei siRNAs an dieser Position in Northern Blots detektierbar waren (vgl. Abb. 9.19.). Eine Analyse der genomischen Skipper Fragmente für den Bereich des neu entdeckten zweiten „*hot spot*“ für Skipper spezifische siRNAs (vgl. Abb. 9.20. zweites Rechteck), ergab keine Hinweise auf längere doppelsträngige Sekundärstrukturen in diesem Bereich (Daten nicht gezeigt). Daher können zur Biogenese dieser siRNAs im *rrpC* Deletionsstamm derzeit keine Hypothese gebildet werden.

Interessanter Weise konnte in *rrpA* Deletionsstämmen eine deutliche Anreicherung von längeren Skipper Transkripten festgestellt werden (vgl. Abb. 9.19.), was darauf hindeutet, dass RrpA in RNA-vermitteltes *Silencing* von Skipper involviert ist. Darüber hinaus wurden in diesen Stämmen im Vergleich zu AX2 Wildtyp, geringe Mengen von Skipper spezifischen siRNAs detektiert, was auch hier als Anreicherung primärer siRNAs in Abwesenheit von RrpA interpretiert werden könnte. Ausgehend von diesen primären siRNAs würden dann sekundäre siRNAs entweder im *guiding* oder *priming* Modus durch RrpA synthetisiert, welche zu RNA-vermitteltem *Silencing* führen würden. Da im *drnB* Deletionsstamm im Vergleich zum *rrpA* Deletionsstamm eine 10-fach höhere Menge von Skipper Transkripten gemessen wurde (vgl. Abb. 9.19.), könnte dies darauf hindeuten, dass durch RrpA synthetisierte längere doppelsträngige Bereiche durch DrnB in sekundäre siRNAs prozessiert werden. In Abwesenheit von DrnB würden sich somit Effekte überlagern, d.h. erhöhte Transkription von Skipper und Anreicherung von längeren RrpA Syntheseprodukten. Diese Hypothese beinhaltet jedoch, dass sekundäre siRNAs bei transkriptionellen *Silencing* verbraucht werden, da diese in AX2 Wildtyp in Northern Blots nicht nachweisbar waren.

Eine weitere Hypothese zur Erklärung der Anreicherung von Skipper siRNAs und miRNAs in *rrpC* Deletionsstämmen kann basierend auf Studien der RdRP *rrf-3* in *C. elegans* entwickelt werden. In diesen konnte nachgewiesen werden, dass ein *knock out* von *rrf-3* zu einer substanziellen Steigerung der Sensitivität von RNAi führte, weswegen der *rrf-3 knock out* Stamm als hypersensitive RNAi Mutante bezeichnet wurde (Sijen et al., 2001; Simmer et al., 2002). RNAi Hypersensitivität könnte dadurch entstehen, dass im *rrpC* Deletionsstamm eine vermutete Interaktion zwischen RrpC und DrnA unterbunden wäre, wodurch die Aktivität und Substratspezifität von DrnA nicht mehr reguliert wird. Dies könnte im Folgenden dazu führen, dass DrnA primäre miRNA Transkripte und intramolekulare *hairpin* Strukturen von Skipper Transkripten als zusätzliche Substrate erkennt und zu siRNAs prozessiert. Die Interaktion zwischen RrpC und DrnA, könnte eine direkte Kopplung der Synthese von dsRNA und Prozessierung dieser, beinhalten. Eine derartige Verbindung von Doppelstrangsynthese durch RdRPs im *priming* Modus und der nachfolgenden Prozessierung des Doppelstrangs durch Dicer Homologe konnte auch in *S. pombe* nachgewiesen werden (Colmenares et al., 2007). Darüber hinaus wurde in *T. thermophila* gezeigt, dass durch diesen Mechanismus eine Spezifität von Dicer für dsRNA Moleküle mit 5'-Triphosphat erreicht wird (Lee and Collins, 2007). DrnB erscheint als möglicher Interaktionspartner für RrpC unwahrscheinlich, da nach Deletion von *drnB* keine Anreicherung von längeren DIRS-1 Transkripten bzw. eine Reduktion von siRNAs beobachtet wurde.

Grundsätzlich deuten die derzeit verfügbaren Daten darauf hin, dass in die Stilllegung von Skipper RNA-vermitteltes *Silencing* aber auch direkte Heterochromatin Bildung involviert sind, welche einen komplexen Stilllegungsmechanismus bilden. Dies könnte auch ursächlich sein, für die relativ hohen Varianzen der Resultate, zwischen *single*, *double* und *triple* Deletionsstämmen. Daher sind weitere Untersuchungen, vor allem bezüglich der Entstehung von Skipper spezifischen siRNAs und längeren Transkripten in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen notwendig, um die Daten dieser Arbeit umfassend interpretieren zu können.

10.4. Das CadA Reportersystem

Die artifizielle Stilllegung von Genen durch Expression einer sequenzhomologen *hairpin* RNA ist in vielen Organismen ein häufig verwendetes molekularbiologisches Werkzeug. Derartige Konstrukte können auch für Reportersysteme zur funktionellen Charakterisierung von RdRPs in RNA-vermittelten Genregulationsprozessen eingesetzt werden. Basierend auf extrachromosomalen Vektoren konnte das CadA Reportersystem erfolgreich entwickelt werden. Nach Transformation in *D. discoideum* wurden auf extrachromosomalen Vektoren im Gegensatz zu genomisch integrierenden Vektoren keine Marker für Heterochromatin nachgewiesen (Dubin, 2010; Doktorarbeit), weswegen eine Beeinflussung des Reportersystems durch Heterochromatin-Bildung unwahrscheinlich erscheint.

Durch Expression von zum *cadA* Gen sequenzhomologer *antisense* und *hairpin* Konstrukte wurden in allen untersuchten RdRP Deletionsstämmen *cadA* spezifische siRNAs generiert, die jedoch nur im Fall von *cadA hairpin II* RNAi-vermitteltes post-transkriptionelles *Silencing* des Endogens *cadA* auslösten. Signifikante Mengenunterschiede von *cadA* siRNAs zwischen den jeweiligen Deletionsstämmen im Vergleich zu AX2 Wildtyp wurden dabei nicht festgestellt (vgl. Abb. 9.25.). Demnach sind RdRPs nicht an der Biogenese von *cadA* spezifischen siRNAs beteiligt und somit ist keines dieser Enzyme eine essentielle Komponente für RNAi-vermitteltes post-transkriptionelles *Silencing* in *D. discoideum*. Im Fall von *cadA hairpin II* könnte die Bindung von *cadA* siRNAs an ein Argonauten Homolog in *D. discoideum* (Cerutti and Casas-Mollano, 2006), in der Folge zum Abbau der *cadA* mRNA führen. Derartige durch Argonauten Proteine induzierte Abbaumechanismen wurden für zahlreiche Organismen beschrieben (zusammengefasst in Hock and Meister, 2008; Hutvagner and Simard, 2008).

Da im CadA Reportersystem keine Synthese von sekundären siRNAs durch RdRPs beobachtet wurde, korreliert die Menge erzeugter *cadA* siRNAs direkt mit Expressionsstärke und Prozessierungseffizienz des primären Auslösers, d.h. des *Silencing* Konstrukts. Diese direkte Korrelation erklärt, weshalb nur mit dem *cadA hairpin II*, jedoch nicht mit *cadA hairpin III* oder *IV* RNAi-vermitteltes post-transkriptionelles *Silencing* von CadA ausgelöst wurde. Da die Länge des doppelsträngigen Bereichs in *cadA hairpin III* und *IV* im Vergleich zum *hairpin II* um 60% reduziert war, führt dies bei angenommener gleicher Expressionsstärke und Prozessierungseffizienz zu einer deutlichen Reduktion der *cadA* siRNA Mengen, welches experimentell auch in Northern Blots nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 9.26.; 13.4.). In diesem Modell reichen die durch Expression von *hairpin III* und *IV* erzeugten siRNA Mengen nicht aus, um RNAi-vermitteltes *Silencing* von *cadA* auszulösen.

Zumindest indirekt wird diese Hypothese durch die Analyse des Stilllegungsmechanismus von DIRS-1 unterstützt. Auch hier erfolgt ein Abbau längerer Transkripte nur nach Akkumulation von siRNAs durch RrpC (vgl. Abschnitt 9.5.1.). Eine direkte Korrelation zwischen der Stärke des primären Auslösers und verursachtem *Silencing* konnte auch in Organismen ohne zellulär kodierte RdRPs beobachtet werden. Dies wurde bei direkter Injektion langer doppelsträngiger RNA in Embryonen von *Drosophila* (Kennerdell and Carthew, 1998), direkter Transfektion von siRNAs in humane Zelllinien (Miyagishi et al., 2003) oder bei Expression einer *hairpin* RNA unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors in *Trypanosoma brucei* (Shi et al., 2000) festgestellt. Da jedoch *cadA hairpin* II und *cadA hairpin* III bzw. IV unterschiedliche Bereiche der kodierenden Sequenz abdecken, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Unterschiede durch einen Positionseffekt verursacht werden. Dem widerspricht jedoch, dass auch mit dem *antisense* Konstrukt, welches die gesamte mRNA abdeckte, kein *Silencing* hervorgerufen wurde. Die hierbei detektierten *cadA* siRNAs entstehen sehr wahrscheinlich auch in diesem Fall durch direkte Hybridisierung von mRNA und *antisense* RNA und Prozessierung des dadurch gebildeten Doppelstrangs durch ein Dicer-ähnliches Protein in *D. discoideum*.

Eine vermutete direkte Korrelation zwischen primärem Auslöser und resultierender *Silencing* Effizienz könnte auch als Erklärung dafür dienen, dass bei Verwendung des *cadA hairpin* II Konstrukts bei Selektion mit Geneticin im Vergleich zu Blasticidin, schwächeres *Silencing* beobachtet wurde (vgl. Abb. 9.23. bzw 9.25.). Blasticidin verursacht im Vergleich zu Geneticin eine effizientere Selektion (zusammengefasst in Gaudet et al., 2007), was sich vermutlich positiv auf die Kopienzahl der extrachromosomalen Vektoren in *D. discoideum* auswirkt. Unterstützt wird dies durch Untersuchungen von B. Boesler (Abt. Genetik, Universität Kassel), der bei Verwendung des Vektors pDM304 *cadA hairpin* II und bei stärkerer Selektion mit Geneticin (20 µg/mL G418) ein ähnlich starkes *Silencing* von *cadA* beobachten konnte, wie bei Einsatz des gleichen *hairpin* Konstrukts unter Blasticidin-Selektion (persönliche Mitteilung B. Boesler).

Für alle untersuchten *hairpin* Konstrukte (II – IV) wurde eine Prozessierung zu siRNAs nachgewiesen (vgl. Abb. 9.25; 9.26; 13.4.), obgleich die exprimierte *hairpin* RNA nicht zu detektieren war. Da diese Prozessierung auch im *drnB* Deletionsstamm unverändert erfolgte, lässt dies den Schluss zu, dass die Prozessierung von *hairpin* Konstrukten durch das Dicer-ähnliche Protein DrnA erfolgt. Da DrnA vermutlich essentiell in *D. discoideum* ist (persönliche Mitteilung C. Hammann), können hierzu jedoch derzeit keine direkten Untersuchungen erfolgen. Die Dicer-ähnlichen Proteine DrnA und DrnB in *D. discoideum*

enthalten keine Helicase und PAZ-Domäne. Da aber RdRPs in *D. discoideum* eine Helicase Domäne enthalten wurde postuliert, dass ein „Domänen Tausch“ zwischen den Dicer-ähnlichen Proteinen und RdRPs stattgefunden haben könnte (Martens et al., 2002). Die PAZ-Domäne dient in anderen Dicer dazu, in RNA Doppelsträngen exakt 21 bp zu messen und so den Schnittpunkt festzulegen („*molecular ruler*“ Funktion) (Macrae et al., 2006). Überraschend ist deshalb, dass Dicer-ähnliche Proteine in *D. discoideum* dennoch 21mere erzeugen, wie die Analyse von CadA und β -Gal *hairpin* Konstrukten sowie frühere Arbeiten gezeigt haben (Martens et al., 2002; Novotny et al., 2001; Popova et al., 2006). In anderen Organismen konnten als Interaktionspartner von Dicer-ähnlichen Proteinen dsRBD Proteine, Argonauten Proteine sowie PIWI Proteine, aber auch RNA Helicase ähnliche Proteine wie z.B. DHR-1 in *C. elegans*, identifiziert werden (zusammengefasst in Jaskiewicz and Filipowicz, 2008). Daher ist anzunehmen, dass auch DrnA und DrnB in *D. discoideum* Komponenten von Multiproteinkomplexen sind, welche dann eine spezifische Prozessierung von dsRNA zu siRNAs oder miRNAs vermitteln. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen derartige Proteinkomplexe aus *D. discoideum* zu isolieren, da funktionelle Protein-Tags und Methoden für derartige Untersuchungen für diesen Modellorganismus noch nicht etabliert werden konnten.

Da RrpC in die Synthese von endogenen siRNAs involviert ist (vgl. Abschnitt 9.5.), deutet dies darauf hin, dass RdRPs in *D. discoideum* eine hohe Substratspezifität aufweisen und daher CadA als artifizielles Substrat offenbar nicht erkennen. Im Genom von *D. discoideum* konnten in einer Datenbanksuche in proteinkodierenden Sequenzen keine längeren *in cis* kodierte invertierte *Repeat*-Sequenzen gefunden werden (Graf et al., 2004). Die offenbare Abwesenheit von natürlich vorkommenden längeren *hairpin* RNAs sequenzhomolog zu mRNAs, könnte ursächlich dafür sein, dass die artifiziiell generierten *cadA hairpin* RNAs nicht zur Definition von *cadA* als Substrat für RdRPs genügen.

10.5. Das β -Gal Reportersystem

Basierend auf dem Transgen *lacZ* wurde mit dem β -Gal Reportersystem ein zweites unabhängiges System zur Analyse des RNAi Mechanismus in RdRP Deletionsstämmen entwickelt. Auch hier sollte durch Expression sequenzhomologer RNA Konstrukte ein post-transkriptionelles *Silencing* von *lacZ* ausgelöst werden.

Zur Expression von *lacZ* wurde ein integrierender Vektor mit Genitacin-Selektionsmarker verwendet. Diese Vektoren integrieren in einem oder mehreren *Clustern* von ca. 100 Kopien in perizentromerische Bereiche in das Genom von *D. discoideum*. In ChIP Analysen wurden auf diesen *Clustern* euchromatische und heterochromatische Marker, sowie die zentromerische Histonvariante H3v1 lokalisiert (Dubin, 2010; Doktorarbeit). Daher könnten die beobachteten Varianzen der β -Gal Aktivität nach Sporulation der Expressionsstämme auf epigenetische Veränderungen zurückgeführt werden. Die nachfolgende Transformation eines leeren Vektors, beeinflusste die Expressionstärke des Transgens in der resultierenden Transformationspopulation nur geringfügig (vgl. Abb. 9.30.). Daher können die analysierten Expressionsunterscheide des Transgens auf die Expression und Prozessierung des jeweiligen *Silencing* Konstrukts zurückgeführt werden.

Erstaunlicherweise wurde trotz eines vergleichbaren Aufbaus mit dem β -Gal Reportersystem im Gegensatz zum CadA Reportersystem kein RNA Abbau beobachtet. Stattdessen verursachte die Expression von β -gal *antisense* oder *hairpin* RNA in den untersuchten RdRP und *drnB* Deletionsstämmen eine translationale Repression von β -Gal (vgl. Abb. 9.31. und 9.33.). Die erzeugten β -gal spezifischen siRNAs gleichen insofern miRNAs in Pflanzen, da diese nahezu vollständige oder sogar vollständige Komplementarität zur kodierenden Sequenz der Ziel mRNA aufweisen können. Dennoch wird auch hier translationale Repression, neben Spaltung und Abbau der mRNA, beobachtet (zusammengefasst in Voinnet, 2009). Die zusätzlich auftretenden Degradationsprodukte am 3' Ende der β -Gal mRNA, besonders nach Expression der *antisense* RNA (vgl. Abb. 13.6. B) deuten daraufhin, dass neben translationaler Repression auch Degradation der mRNA hervorgerufen wird, wie sie auch für microRNAs von Pflanzen und Tieren beschrieben wird (zusammengefasst in Huntzinger and Izaurralde, 2011). Studien in humanen Zelllinien mit ähnlichen Reportersystemen deuten ebenfalls auf eine funktionelle Austauschbarkeit zwischen siRNAs und miRNAs hin (Doench et al., 2003; Zeng et al., 2003). Ob dies ein natürliches Phänomen ist oder durch die Reportersysteme bedingt, lässt sich derzeit nicht entscheiden. Die beobachtete translationale Repression könnte durch Bindung von β -gal siRNAs an ein Argonauten Homolog in *D. discoideum* induziert werden. Argonauten Proteine mit

inkorporierter microRNA können auf verschiedenen Ebenen translationale Repression bewirken. Neben der Inhibition der Initiation (Meister, 2007) und der Elongation (Olsen and Ambros, 1999; Petersen et al., 2006) wurde auch der Abbau von naszierenden Polypeptidketten (Nottrott et al., 2006) durch Argonauten Proteine beschrieben.

Mit dem β -Gal Reportersystem wurde erstmals ein *spreading* von β -gal siRNAs, in 5' Richtung zur Position der *hairpin* RNA, nachgewiesen. *Spreading* war nur in Abhängigkeit von RrpC und DrnB zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass primäre siRNAs, welche aus der Prozessierung der *hairpin* RNA entstehen, als Primer für RrpC fungieren. Nach Synthese von längeren doppelsträngigen Bereichen durch RrpC, werden diese nachfolgend durch das Dicer-ähnliche Protein DrnB in sekundäre siRNAs prozessiert. In diesem Modell würde RrpC *in priming* Modus sekundäre siRNAs synthetisieren und somit funktionell der RdRP QDE-1 in *N. crassa* gleichen (Makeyev and Bamford, 2002). Interessanter Weise erfolgt die Prozessierung von sekundären β -gal siRNAs wie die Biogenese endogener microRNAs in Abhängigkeit von *drnB* (Hinas et al., 2007). Die aus der Aktivität der RrpC resultierenden sekundären siRNAs sind jedoch für die translationale Repression nicht notwendig, da dieses Phänomen auch im RdRP *triple* Deletionsstamm in selber Stärke auftrat. Daher sind die aus der Prozessierung der *hairpin* RNA entstehenden primären siRNAs ausreichend, um die translationale Repression auszulösen.

Auch bei diesem Reportersystem erfolgte eine Prozessierung der β -gal *hairpin* RNA zu primären siRNAs, sehr wahrscheinlich durch DrnA. Dieser Prozess ist unabhängig von der Expression des Transgens, da β -gal siRNAs auch in Stämmen ohne Transgen nachgewiesen wurden (vgl. Abb. 9.32.). In beiden Fällen konnte die exprimierte β -gal *hairpin* RNA nicht detektiert werden. Nach Transformation der *antisense* RNA wurden ebenfalls in allen untersuchten Stämmen siRNAs nachgewiesen (vgl. Abb. 9.33.), welche auch hier wahrscheinlich durch direkte Hybridisierung von *lacZ* mRNA und *antisense* RNA entstehen. In diesem Fall erscheint eine Prozessierung der resultierenden dsRNA durch DrnA wahrscheinlich, da β -gal siRNAs und translationale Repression auch nach Deletion von *drnB* nachgewiesen wurden. Nach Expression von β -gal *antisense* bzw. *hairpin* RNA ergab eine vergleichende Analyse der entstehenden siRNA Mengen, dass aus der Transkription und Prozessierung des *antisense* Konstrukts wesentlich geringere und stark schwankende Mengen resultierten (vgl. Abb. 13.8.). Ein vergleichbares β -Gal Reportersystem wurde auch für *S. pombe* etabliert. In diesen Studien konnte jedoch nach Expression von sequenzzhomologen *antisense* und *hairpin* RNAs ein RNAi-vermitteltes post-transkriptionelles *Silencing* ausgelöst werden. Die resultierenden β -gal siRNA Mengen fielen auch hier bei Expression von

antisense Konstrukten deutlich geringer aus (Raponi and Arndt, 2003). Dies deutet daraufhin, dass die Prozessierung von *hairpin* RNAs zu siRNAs wesentlich effizienter verläuft, als die Prozessierung von *antisense* RNAs, welches in beiden Reportersystemen auch für *D. discoideum* beobachtet wurde. Ursächlich hierfür könnte sein, dass *in vivo* die Bildung von längeren Doppelsträngen zwischen *antisense* RNA und mRNA trotz perfekter Komplementarität ein wenig effizient verlaufender Vorgang ist. Eine Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb der *antisense* Transkripte könnte hierbei der Bildung dieser entgegenwirken. Somit wäre die Formierung von *antisense* / mRNA Doppelsträngen der limitierende Faktor bei der Entstehung von siRNAs nach Expression einer *antisense* RNA. Unterstützend hierzu stehen Untersuchungen des CopA/CopT Regulationssystems in Bakterien, da auch hier trotz Sequenzkomplementarität kein vollständiger RNA Doppelstrang *in vivo* ausgebildet wird (zusammengefasst in Wagner et al., 2002).

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in geringem Umfang transkriptionelles und post-transkriptionelles *Silencing* durch β -gal siRNAs hervorgerufen wird. Aufgrund der beobachteten Instabilität der β -gal mRNA auch in Abwesenheit von *Silencing* Konstrukten (vgl. Abb. 13.6. A) konnte dies jedoch mit den gewählten Methoden nicht analysiert werden.

In beiden Reportersystemen wurden keine Hinweise auf Co-Suppression, wie z.B. für Petunien (Napoli et al., 1990) oder *C. elegans* (Guo and Kemphues, 1995) beschrieben, gefunden. Dies legt den Schluss nahe, dass β -Gal und CadA *sense* RNAs in *D. discoideum* nicht als aberrant erkannt werden und somit kein RNAi-vermitteltes *Silencing* bzw. translationale Repression auslösen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des CadA und β -Gal Reportersystems, dass eine Amplifikation des primären Auslösers durch RdRP Aktivität für RNAi-vermitteltes post-transkriptionelles *Silencing* und translationale Repression in *D. discoideum* nicht zwingend notwendig ist. Die Entbehrlichkeit einer Akkumulation von siRNAs durch RdRP Aktivität wurde auch in *N. crassa* nachgewiesen. Hierbei konnte auch in *ego-1 knock out* Stämmen durch Einführung von dsRNA, jedoch nicht bei Verwendung einzelsträngiger RNA, *Silencing* verursacht werden (Catalanotto et al., 2004). Umgekehrt führte eine Überexpression von *ego-1* zu erhöhten *Silencing* (Forrest et al., 2004). Hervorzuheben gilt, dass trotz eines vergleichbaren Aufbaus der beiden Reportersysteme, völlig verschiedene durch siRNAs induzierte Effekte beobachtet wurden. Eine weitere umfassende Analyse der zugrundeliegenden mechanistischen Prozesse, könnte daher zum besseren Verständnis von RNA-vermittelten Regulationsprozessen in *Dictyostelium discoideum* beitragen.

11. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AMP	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
as	<i>antisense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BS ^(r)	Blasticidin-Resistenz
C	Cytosin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CTP	Cytidintriphosphat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribnukleinsäure
ds	doppelsträngig
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
G418	Geneticin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTC	Guanidiniumthiocyanat
GTP	Guanisintriphosphat
h	Stunden
HEPES	2-(4-/2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
hp	<i>hairpin</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kB	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
KO	<i>knock out</i>
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm

min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ng	Nanogramm
NP40	Nonident [®] P40
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNK	Polynukleotidkinase
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
rNTP	Ribonukleotid
s	<i>sense</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
°C	Grad Celsius

12. Literaturverzeichnis

- Ahlquist, P. (2002) RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*, **296**, 1270-1273.
- Aliyari, R., Wu, Q., Li, H.W., Wang, X.H., Li, F., Green, L.D., Han, C.S., Li, W.X. and Ding, S.W. (2008) Mechanism of induction and suppression of antiviral immunity directed by virus-derived small RNAs in *Drosophila*. *Cell Host Microbe*, **4**, 387-397.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M. and Carrington, J.C. (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, **121**, 207-221.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J. and Stark, G.R. (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5350-5354.
- Ambros, V., Lee, R.C., Lavanway, A., Williams, P.T. and Jewell, D. (2003) MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*, **13**, 807-818.
- Angell, S.M. and Baulcombe, D.C. (1997) Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *Embo J*, **16**, 3675-3684.
- Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K. and Tabara, H. (2007) In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *Embo J*, **26**, 5007-5019.
- Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M.J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., et al. (2006) A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, **442**, 203-207.
- Aspegren, A., Hinas, A., Larsson, P., Larsson, A. and Soderbom, F. (2004) Novel non-coding RNAs in *Dictyostelium discoideum* and their expression during development. *Nucleic Acids Res*, **32**, 4646-4656.
- Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P. and Bartel, D.P. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, **455**, 64-71.
- Baltimore, D., Eggers, H.J., Franklin, R.M. and Tamm, I. (1963) Poliovirus-induced RNA polymerase and the effects of virus-specific inhibitors on its production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **49**, 843-849.
- Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **136**, 215-233.
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F. and Cullin, C. (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **21**, 3329-3330.
- Bayne, E.H., White, S.A., Kagansky, A., Bijos, D.A., Sanchez-Pulido, L., Hoe, K.L., Kim, D.U., Park, H.O., Ponting, C.P., Rappsilber, J., et al. (2010) Stc1: a critical link between RNAi and chromatin modification required for heterochromatin integrity. *Cell*, **140**, 666-677.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J. and Izaurralde, E. (2006) MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **71**, 523-530.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V. and Hannon, G.J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, **35**, 215-217.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.

- Blusch, J., Alexander, S. and Nellen, W. (1995) Multiple signal transduction pathways regulate discoidin I gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation*, **58**, 253-260.
- Borchert, G.M., Lanier, W. and Davidson, B.L. (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 1097-1101.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R. and Zhu, J.K. (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, **123**, 1279-1291.
- Bouche, N. and Bouchez, D. (2001) *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Curr Opin Plant Biol*, **4**, 111-117.
- Bracht, J., Hunter, S., Eachus, R., Weeks, P. and Pasquinelli, A.E. (2004) Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *Rna*, **10**, 1586-1594.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R. and Hannon, G.J. (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, **128**, 1089-1103.
- Britten, R.J. and Davidson, E.H. (1969) Gene regulation for higher cells: a theory. *Science*, **165**, 349-357.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L. and Voinnet, O. (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, **320**, 1185-1190.
- Buhler, M. and Moazed, D. (2007) Transcription and RNAi in heterochromatic gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 1041-1048.
- Cai, X., Hagedorn, C.H. and Cullen, B.R. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*, **10**, 1957-1966.
- Calo, S., Nicolas, F.E., Vila, A., Torres-Martinez, S. and Ruiz-Vazquez, R.M. (2012) Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Mol Microbiol*, **83**, 379-394.
- Cappello, J., Cohen, S.M. and Lodish, H.F. (1984) *Dictyostelium* transposable element DIRS-1 preferentially inserts into DIRS-1 sequences. *Mol Cell Biol*, **4**, 2207-2213.
- Cappello, J., Handelsman, K. and Lodish, H.F. (1985) Sequence of *Dictyostelium* DIRS-1: an apparent retrotransposon with inverted terminal repeats and an internal circle junction sequence. *Cell*, **43**, 105-115.
- Carthew, R.W. and Sontheimer, E.J. (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, **136**, 642-655.
- Catalanotto, C., Pallotta, M., ReFalo, P., Sachs, M.S., Vayssie, L., Macino, G. and Cogoni, C. (2004) Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol*, **24**, 2536-2545.
- Cerutti, H. and Casas-Mollano, J.A. (2006) On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet*, **50**, 81-99.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. and Shiekhattar, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, **436**, 740-744.
- Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, **15**, 532-534, 536-537.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.

- Chung, W.J., Okamura, K., Martin, R. and Lai, E.C. (2008) Endogenous RNA interference provides a somatic defense against *Drosophila* transposons. *Curr Biol*, **18**, 795-802.
- Clarke, M., Yang, J. and Kayman, S.C. (1988) Analysis of the prestarvation response in growing cells of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Genet*, **9**, 315-326.
- Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J., Selker, E.U. and Macino, G. (1996) Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *Embo J*, **15**, 3153-3163.
- Cogoni, C. and Macino, G. (1999) Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, **399**, 166-169.
- Cogoni, C., Romano, N. and Macino, G. (1994) Suppression of gene expression by homologous transgenes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **65**, 205-209.
- Cohen, S.M., Cappello, J. and Lodish, H.F. (1984) Transcription of *Dictyostelium discoideum* transposable element DIRS-1. *Mol Cell Biol*, **4**, 2332-2340.
- Colmenares, S.U., Buker, S.M., Buhler, M., Dlakic, M. and Moazed, D. (2007) Coupling of double-stranded RNA synthesis and siRNA generation in fission yeast RNAi. *Mol Cell*, **27**, 449-461.
- Conant, G.C. and Wagner, A. (2004) Duplicate genes and robustness to transient gene knock-downs in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Biol Sci*, **271**, 89-96.
- Curaba, J. and Chen, X. (2008) Biochemical activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase 6. *J Biol Chem*, **283**, 3059-3066.
- Czech, B., Malone, C.D., Zhou, R., Stark, A., Schlingehayde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J.A., Sachidanandam, R., et al. (2008) An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*, **453**, 798-802.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Mueller, E. and Baulcombe, D.C. (2000a) Potato virus X amplicons in arabidopsis mediate genetic and epigenetic gene silencing. *Plant Cell*, **12**, 369-379.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (2000b) An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, **101**, 543-553.
- Damer, C.K., Bayeva, M., Kim, P.S., Ho, L.K., Eberhardt, E.S., Socec, C.I., Lee, J.S., Bruce, E.A., Goldman-Yassen, A.E. and Naliboff, L.C. (2007) Copine A is required for cytokinesis, contractile vacuole function, and development in *Dictyostelium*. *Eukaryot Cell*, **6**, 430-442.
- De Lozanne, A. and Spudich, J.A. (1987) Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science*, **236**, 1086-1091.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F. and Hannon, G.J. (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, **432**, 231-235.
- Ding, S.W. and Voinnet, O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, **130**, 413-426.
- Dingermann, T., Reindl, N., Brechner, T., Werner, H. and Nerke, K. (1990) Nonsense suppression in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Genet*, **11**, 410-417.
- Dingermann, T., Reindl, N., Werner, H., Hildebrandt, M., Nellen, W., Harwood, A., Williams, J. and Nerke, K. (1989) Optimization and in situ detection of *Escherichia coli* beta-galactosidase gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Gene*, **85**, 353-362.
- Doench, J.G., Petersen, C.P. and Sharp, P.A. (2003) siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*, **17**, 438-442.
- Dubin, M. (2010) Nuclear organisation and epigenetic regulation of gene expression in *Dictyostelium discoideum*. Doktorarbeit Abteilung Genetik, Universität Kassel.

- Dubin, M. and Nellen, W. (2010) A versatile set of tagged expression vectors to monitor protein localisation and function in *Dictyostelium*. *Gene*, **465**, 1-8.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. and Sharp, P.A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 457-467.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glockner, G., Rajandream, M.A., Sugang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., et al. (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **435**, 43-57.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, **15**, 188-200.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001c) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J*, **20**, 6877-6888.
- Ender, C., Krek, A., Friedlander, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N. and Meister, G. (2008) A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell*, **32**, 519-528.
- Eulalio, A., Triteschler, F. and Izaurralde, E. (2009) The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *Rna*, **15**, 1433-1442.
- Faix, J., Kreppel, L., Shaulsky, G., Schleicher, M. and Kimmel, A.R. (2004) A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Res*, **32**, e143.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, **132**, 6-13.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fleige, S. and Pfaffl, M.W. (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*, **27**, 126-139.
- Földesi, B. (2010) Posttranslationale Chromatin-Modifikationen in *Dictyostelium discoideum*. Doktorarbeit Abteilung Genetik, Universität Kassel.
- Forrest, E.C., Cogoni, C. and Macino, G. (2004) The RNA-dependent RNA polymerase, QDE-1, is a rate-limiting factor in post-transcriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res*, **32**, 2123-2128.
- Forstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M., Bratu, D.P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W.E. and Zamore, P.D. (2005) Normal microRNA maturation and germline stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol*, **3**, e236.
- Gaudet, P., Pilcher, K.E., Fey, P. and Chisholm, R.L. (2007) Transformation of *Dictyostelium discoideum* with plasmid DNA. *Nat Protoc*, **2**, 1317-1324.
- Gent, J.I., Lamm, A.T., Pavelec, D.M., Maniar, J.M., Parameswaran, P., Tao, L., Kennedy, S. and Fire, A.Z. (2010) Distinct phases of siRNA synthesis in an endogenous RNAi pathway in *C. elegans* soma. *Mol Cell*, **37**, 679-689.
- Gerisch, G. and Malchow, D. (1976) Cyclic AMP receptors and the control of cell aggregation in *Dictyostelium*. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, **7**, 49-68.
- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M.D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E.L., Zapp, M.L., Weng, Z., et al. (2008) Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science*, **320**, 1077-1081.

- Ghildiyal, M. and Zamore, P.D. (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*, **10**, 94-108.
- Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J. and Schier, A.F. (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, **312**, 75-79.
- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J. and Carmell, M.A. (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, **442**, 199-202.
- Glockner, G. and Heide, A.J. (2009) Centromere sequence and dynamics in Dictyostelium discoideum. *Nucleic Acids Res*, **37**, 1809-1816.
- Glockner, G., Szafranski, K., Winckler, T., Dingermann, T., Quail, M.A., Cox, E., Eichinger, L., Noegel, A.A. and Rosenthal, A. (2001) The complex repeats of Dictyostelium discoideum. *Genome Res*, **11**, 585-594.
- Gomer, R.H. and Firtel, R.A. (1987) Cell-autonomous determination of cell-type choice in Dictyostelium development by cell-cycle phase. *Science*, **237**, 758-762.
- Graf, S., Borisova, B.E., Nellen, W., Steger, G. and Hammann, C. (2004) A database search for double-strand containing RNAs in Dictyostelium discoideum. *Biol Chem*, **385**, 961-965.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, **123**, 631-640.
- Grewal, S.I. (2010) RNAi-dependent formation of heterochromatin and its diverse functions. *Curr Opin Genet Dev*, **20**, 134-141.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S. and Enright, A.J. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, **36**, D154-158.
- Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B.J., Chiang, H.R., King, N., Degnan, B.M., Rokhsar, D.S. and Bartel, D.P. (2008) Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*, **455**, 1193-1197.
- Grivna, S.T., Beyret, E., Wang, Z. and Lin, H. (2006) A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*, **20**, 1709-1714.
- Gu, Z., Steinmetz, L.M., Gu, X., Scharfe, C., Davis, R.W. and Li, W.H. (2003) Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature*, **421**, 63-66.
- Gunawardane, L.S., Saito, K., Nishida, K.M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H. and Siomi, M.C. (2007) A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in Drosophila. *Science*, **315**, 1587-1590.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S. and Bartel, D.P. (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, **466**, 835-840.
- Guo, S. and Kemphues, K.J. (1995) par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, **81**, 611-620.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D. (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J*, **21**, 4671-4679.
- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature*, **404**, 293-296.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H. and Kim, V.N. (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, **18**, 3016-3027.
- He, X.J., Chen, T. and Zhu, J.K. (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res*, **21**, 442-465.

- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T. and Baulcombe, D.C. (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science*, **308**, 118-120.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 1026-1030.
- Hildebrandt, M. and Nellen, W. (1992) Differential antisense transcription from the Dictyostelium EB4 gene locus: implications on antisense-mediated regulation of mRNA stability. *Cell*, **69**, 197-204.
- Hinas, A., Larsson, P., Avesson, L., Kirsebom, L.A., Virtanen, A. and Soderbom, F. (2006) Identification of the major spliceosomal RNAs in Dictyostelium discoideum reveals developmentally regulated U2 variants and polyadenylated snRNAs. *Eukaryot Cell*, **5**, 924-934.
- Hinas, A., Reimegard, J., Wagner, E.G., Nellen, W., Ambros, V.R. and Soderbom, F. (2007) The small RNA repertoire of Dictyostelium discoideum and its regulation by components of the RNAi pathway. *Nucleic Acids Res*.
- Hock, J. and Meister, G. (2008) The Argonaute protein family. *Genome Biol*, **9**, 210.
- Hong, E.J., Villen, J., Gerace, E.L., Gygi, S.P. and Moazed, D. (2005) A cullin E3 ubiquitin ligase complex associates with Rik1 and the Clr4 histone H3-K9 methyltransferase and is required for RNAi-mediated heterochromatin formation. *RNA Biol*, **2**, 106-111.
- Horn, P.J., Bastie, J.N. and Peterson, C.L. (2005) A Rik1-associated, cullin-dependent E3 ubiquitin ligase is essential for heterochromatin formation. *Genes Dev*, **19**, 1705-1714.
- Hughes, J.E. and Welker, D.L. (1988) A mini-screen technique for analyzing nuclear DNA from a single Dictyostelium colony. *Nucleic Acids Res*, **16**, 2338.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I. and Preiss, T. (2005) MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16961-16966.
- Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, **12**, 99-110.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T. and Zamore, P.D. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, **293**, 834-838.
- Hutvagner, G. and Simard, M.J. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 22-32.
- Iyer, L.M., Koonin, E.V. and Aravind, L. (2003) Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. *BMC Struct Biol*, **3**, 1.
- Jacob, F. and Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol*, **3**, 318-356.
- Jacobs, S.A. and Khorasanizadeh, S. (2002) Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science*, **295**, 2080-2083.
- Jagannath, A. and Wood, M.J. (2009) Localization of double-stranded small interfering RNA to cytoplasmic processing bodies is Ago2 dependent and results in up-regulation of GW182 and Argonaute-2. *Mol Biol Cell*, **20**, 521-529.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathiou, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J. and Chan, E.K. (2005) Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol*, **7**, 1267-1274.
- Jaskiewicz, L. and Filipowicz, W. (2008) Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing. *Curr Top Microbiol Immunol*, **320**, 77-97.
- Jia, S., Kobayashi, R. and Grewal, S.I. (2005) Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Clr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin. *Nat Cell Biol*, **7**, 1007-1013.

- Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, **95**, 461-470.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Jr., Zhu, J.K., Staskawicz, B.J. and Jin, H. (2006) A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18002-18007.
- Kennerdell, J.R. and Carthew, R.W. (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, **95**, 1017-1026.
- Kessin, R.H. (2001) Dictyostelium - Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity. *Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press*.
- Ketting, R.F. (2011) The many faces of RNAi. *Dev Cell*, **20**, 148-161.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J. and Plasterk, R.H. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, **15**, 2654-2659.
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**, 209-216.
- Kim, K., Lee, Y.S. and Carthew, R.W. (2007) Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. *Rna*, **13**, 22-29.
- Kim, V.N. (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 376-385.
- Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinak, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T. and Mourelatos, Z. (2007) An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, **129**, 1141-1151.
- Knight, S.W. and Bass, B.L. (2001) A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **293**, 2269-2271.
- Kuhlmann, M., Borisova, B.E., Kaller, M., Larsson, P., Stach, D., Na, J., Eichinger, L., Lyko, F., Ambros, V., Soderbom, F., et al. (2005) Silencing of retrotransposons in Dictyostelium by DNA methylation and RNAi. *Nucleic Acids Res*, **33**, 6405-6417.
- Kulkarni, M., Ozgur, S. and Stoecklin, G. (2010) On track with P-bodies. *Biochem Soc Trans*, **38**, 242-251.
- Kurihara, Y. and Watanabe, Y. (2004) Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 12753-12758.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lanet, E., Delannoy, E., Sormani, R., Floris, M., Brodersen, P., Crete, P., Voinnet, O. and Robaglia, C. (2009) Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs. *Plant Cell*, **21**, 1762-1768.
- Lankenau, S., Corces, V.G. and Lankenau, D.H. (1994) The Drosophila micropia retrotransposon encodes a testis-specific antisense RNA complementary to reverse transcriptase. *Mol Cell Biol*, **14**, 1764-1775.
- Lapidot, M. and Pilpel, Y. (2006) Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms. *EMBO Rep*, **7**, 1216-1222.
- Lee, H.C., Aalto, A.P., Yang, Q., Chang, S.S., Huang, G., Fisher, D., Cha, J., Poranen, M.M., Bamford, D.H. and Liu, Y. (2010) The DNA/RNA-dependent RNA polymerase QDE-1 generates aberrant RNA and dsRNA for RNAi in a process requiring replication protein A and a DNA helicase. *PLoS Biol*, **8**.
- Lee, H.C., Chang, S.S., Choudhary, S., Aalto, A.P., Maiti, M., Bamford, D.H. and Liu, Y. (2009a) qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. *Nature*, **459**, 274-277.

- Lee, R.C. and Ambros, V. (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**, 862-864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854.
- Lee, S.R. and Collins, K. (2007) Physical and functional coupling of RNA-dependent RNA polymerase and Dicer in the biogenesis of endogenous siRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 604-610.
- Lee, S.R., Talsky, K.B. and Collins, K. (2009b) A single RNA-dependent RNA polymerase assembles with mutually exclusive nucleotidyl transferase subunits to direct different pathways of small RNA biogenesis. *Rna*.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., et al. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **425**, 415-419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. and Kim, V.N. (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J*, **21**, 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N. (2004a) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J*, **23**, 4051-4060.
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J. and Carthew, R.W. (2004b) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, **117**, 69-81.
- Leng, P., Klatte, D.H., Schumann, G., Boeke, J.D. and Steck, T.L. (1998) Skipper, an LTR retrotransposon of *Dictyostelium*. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2008-2015.
- Levi, S., Polyakov, M. and Egelhoff, T.T. (2000) Green fluorescent protein and epitope tag fusion vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid*, **44**, 231-238.
- Lewis, B.P., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, **120**, 15-20.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305**, 1437-1441.
- Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P. and Wang, X. (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, **301**, 1921-1925.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, **297**, 2053-2056.
- Loomis, W.F. (1975) *Dictyostelium discoideum: A Developmental System*. Academic Press, New York.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. and Kutay, U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, **303**, 95-98.
- Luo, Z. and Chen, Z. (2007) Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 943-958.
- MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V. and Doudna, J.A. (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 512-517.
- Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D. and Doudna, J.A. (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*, **311**, 195-198.

- Maida, Y. and Masutomi, K. (2011) RNA-dependent RNA polymerases in RNA silencing. *Biol Chem*, **392**, 299-304.
- Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W.C. and Masutomi, K. (2009) An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature*, **461**, 230-235.
- Makeyev, E.V. and Bamford, D.H. (2002) Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes. *Mol Cell*, **10**, 1417-1427.
- Maniak, M. and Nellen, W. (1991) 3' processing in Dictyostelium: unusual sequence requirements and interaction with a downstream promoter. *Mol Microbiol*, **5**, 245-251.
- Maniar, J.M. and Fire, A.Z. (2011) EGO-1, a C. elegans RdRP, modulates gene expression via production of mRNA-templated short antisense RNAs. *Curr Biol*, **21**, 449-459.
- Maniataki, E. and Mourelatos, Z. (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*, **19**, 2979-2990.
- Marker, S., Le Mouel, A., Meyer, E. and Simon, M. (2010) Distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for RNAi triggered by double-stranded RNA versus truncated transgenes in Paramecium tetraurelia. *Nucleic Acids Res*, **38**, 4092-4107.
- Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J. and Nilsen, T.W. (2006) Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 1102-1107.
- Marsischky, G. and LaBaer, J. (2004) Many paths to many clones: a comparative look at high-throughput cloning methods. *Genome Res*, **14**, 2020-2028.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T.L., Postlethwait, P. and Nellen, W. (2002) RNAi in Dictyostelium: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol Biol Cell*, **13**, 445-453.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P. and Zamore, P.D. (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, **123**, 607-620.
- Matzke, M.A. and Birchler, J.A. (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*, **6**, 24-35.
- Meister, G. (2007) miRNAs get an early start on translational silencing. *Cell*, **131**, 25-28.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, **15**, 185-197.
- Miyagishi, M., Hayashi, M. and Taira, K. (2003) Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **13**, 1-7.
- Miyoshi, K., Miyoshi, T. and Siomi, H. (2010) Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*, **284**, 95-103.
- Mizuno, T., Chou, M.Y. and Inouye, M. (1984) A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1966-1970.
- Moazed, D. (2009) Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*, **457**, 413-420.
- Moissiard, G., Parizotto, E.A., Himber, C. and Voinnet, O. (2007) Transitivity in Arabidopsis can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *Rna*, **13**, 1268-1278.
- Mokrejs, M., Masek, T., Vopalensky, V., Hlubucek, P., Delbos, P. and Pospisek, M. (2010) IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res*, **38**, D131-136.

- Molnar, A., Csorba, T., Lakatos, L., Varallyay, E., Lacomme, C. and Burgyan, J. (2005) Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J Virol*, **79**, 7812-7818.
- Motamedi, M.R., Verdel, A., Colmenares, S.U., Gerber, S.A., Gygi, S.P. and Moazed, D. (2004) Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. *Cell*, **119**, 789-802.
- Muhlemann, O., Eberle, A.B., Stalder, L. and Zamudio Orozco, R. (2008) Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim Biophys Acta*, **1779**, 538-549.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B. and Cech, T.R. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, **277**, 955-959.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.
- Nellen, W., Silan, C. and Firtel, R.A. (1984) DNA-mediated transformation in Dictyostelium discoideum: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol Cell Biol*, **4**, 2890-2898.
- Ng, K.K., Arnold, J.J. and Cameron, C.E. (2008) Structure-function relationships among RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Top Microbiol Immunol*, **320**, 137-156.
- Nicolas, F.E., Moxon, S., de Haro, J.P., Calo, S., Grigoriev, I.V., Torres-Martinez, S., Moulton, V., Ruiz-Vazquez, R.M. and Dalmay, T. (2010) Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic Acids Res*, **38**, 5535-5541.
- Nielsen, P.R., Nietlispach, D., Mott, H.R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A.G., Murzina, N.V. and Laue, E.D. (2002) Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature*, **416**, 103-107.
- Nottrott, S., Simard, M.J. and Richter, J.D. (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 1108-1114.
- Novotny, J., Diegel, S., Schirmacher, H., Mohrle, A., Hildebrandt, M., Oberstrass, J. and Nellen, W. (2001) Dictyostelium double-stranded ribonuclease. *Methods Enzymol*, **342**, 193-212.
- Obbard, D.J., Gordon, K.H., Buck, A.H. and Jiggins, F.M. (2009) The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **364**, 99-115.
- Okamura, K., Balla, S., Martin, R., Liu, N. and Lai, E.C. (2008a) Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 998.
- Okamura, K., Chung, W.J., Ruby, J.G., Guo, H., Bartel, D.P. and Lai, E.C. (2008b) The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature*, **453**, 803-806.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M. and Lai, E.C. (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, **130**, 89-100.
- Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y.T. and Lai, E.C. (2008c) The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 354-363.
- Olsen, P.H. and Ambros, V. (1999) The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*, **216**, 671-680.

- Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Costa Nunes, P., Pontes, O. and Pikaard, C.S. (2005) Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell*, **120**, 613-622.
- Orban, T.I. and Izaurralde, E. (2005) Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *Rna*, **11**, 459-469.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. and Conklin, D.S. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, **16**, 948-958.
- Pak, J. and Fire, A. (2007) Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science*, **315**, 241-244.
- Pall, G.S., Codony-Servat, C., Byrne, J., Ritchie, L. and Hamilton, A. (2007) Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res*, **35**, e60.
- Pang, K.M., Lynes, M.A. and Knecht, D.A. (1999) Variables controlling the expression level of exogenous genes in *Dictyostelium*. *Plasmid*, **41**, 187-197.
- Parker, J.S., Roe, S.M. and Barford, D. (2005) Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*, **434**, 663-666.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L. and Poethig, R.S. (2004) SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, **18**, 2368-2379.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J. and Sharp, P.A. (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*, **21**, 533-542.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Pfaffl, M.W. (2010) The ongoing evolution of qPCR. *Methods*, **50**, 215-216.
- Pham, J.W., Pellino, J.L., Lee, Y.S., Carthew, R.W. and Sontheimer, E.J. (2004) A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell*, **117**, 83-94.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E. and Filipowicz, W. (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, **309**, 1573-1576.
- Popova, B., Kuhlmann, M., Hinas, A., Soderbom, F. and Nellen, W. (2006) HelF, a putative RNA helicase acts as a nuclear suppressor of RNAi but not antisense mediated gene silencing. *Nucleic Acids Res*, **34**, 773-784.
- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F. and Wang, X. (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, **123**, 621-629.
- Raper, K.D. (1935) *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leafs. *J Agr Res* 50: 135-147.
- Raponi, M. and Arndt, G.M. (2003) Double-stranded RNA-mediated gene silencing in fission yeast. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4481-4489.
- Rasmussen, R. (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, and Nakagawara, K, eds. *Rapid Cycle Realtime PCR, Methods and Applications* Springer Press, Heidelberg; ISBN 3-540-66736-9, 21-34.
- Rayssiguier, C., Thaler, D.S. and Radman, M. (1989) The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature*, **342**, 396-401.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D. and Izaurralde, E. (2005) A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *Rna*, **11**, 1640-1647.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. and Bartel, D.P. (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, **110**, 513-520.

- Romeralo, M., Escalante, R. and Baldauf, S.L. (2012) Evolution and diversity of dictyostelid social amoebae. *Protist*, **163**, 327-343.
- Rosen, E., Sivertsen, A. and Firtel, R.A. (1983) An unusual transposon encoding heat shock inducible and developmentally regulated transcripts in Dictyostelium. *Cell*, **35**, 243-251.
- Rot, G., Parikh, A., Curk, T., Kuspa, A., Shaulsky, G. and Zupan, B. (2009) dictyExpress: a Dictyostelium discoideum gene expression database with an explorative data analysis web-based interface. *BMC Bioinformatics*, **10**, 265.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, **10**, 937-946.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Saito, K., Nishida, K.M., Mori, T., Kawamura, Y., Miyoshi, K., Nagami, T., Siomi, H. and Siomi, M.C. (2006) Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the Drosophila genome. *Genes Dev*, **20**, 2214-2222.
- Salgado, P.S., Koivunen, M.R., Makeyev, E.V., Bamford, D.H., Stuart, D.I. and Grimes, J.M. (2006) The structure of an RNAi polymerase links RNA silencing and transcription. *PLoS Biol*, **4**, e434.
- Sambrook, J., Russell, D.W., (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, the Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Saraiya, A.A. and Wang, C.C. (2008) snoRNA, a novel precursor of microRNA in Giardia lamblia. *PLoS Pathog*, **4**, e1000224.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, **115**, 199-208.
- Seggerson, K., Tang, L. and Moss, E.G. (2002) Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation. *Dev Biol*, **243**, 215-225.
- Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. and Rajewsky, N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, **455**, 58-63.
- Selva, E.M., New, L., Crouse, G.F. and Lahue, R.S. (1995) Mismatch correction acts as a barrier to homeologous recombination in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, **139**, 1175-1188.
- Sewell, E. and Kinsey, J.A. (1996) Tad, a Neurospora LINE-like retrotransposon exhibits a complex pattern of transcription. *Mol Gen Genet*, **252**, 137-145.
- Shabalina, S.A. and Koonin, E.V. (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol*, **23**, 578-587.
- Shaulsky, G. and Kessin, R.H. (2007) The cold war of the social amoebae. *Curr Biol*, **17**, R684-692.
- Shen, P. and Huang, H.V. (1986) Homologous recombination in Escherichia coli: dependence on substrate length and homology. *Genetics*, **112**, 441-457.
- Shi, H., Djikeng, A., Mark, T., Wirtz, E., Tschudi, C. and Ullu, E. (2000) Genetic interference in Trypanosoma brucei by heritable and inducible double-stranded RNA. *Rna*, **6**, 1069-1076.
- Shiu, P.K. and Metzenberg, R.L. (2002) Meiotic silencing by unpaired DNA: properties, regulation and suppression. *Genetics*, **161**, 1483-1495.
- Shiu, P.K., Raju, N.B., Zickler, D. and Metzenberg, R.L. (2001) Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell*, **107**, 905-916.

- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. and Fire, A. (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, **107**, 465-476.
- Sijen, T. and Plasterk, R.H. (2003) Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature*, **426**, 310-314.
- Sijen, T., Steiner, F.A., Thijssen, K.L. and Plasterk, R.H. (2007) Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science*, **315**, 244-247.
- Simmer, F., Tijsterman, M., Parrish, S., Koushika, S.P., Nonet, M.L., Fire, A., Ahringer, J. and Plasterk, R.H. (2002) Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Curr Biol*, **12**, 1317-1319.
- Singleton, C.K., Zinda, M.J., Mykytko, B. and Yang, P. (1998) The histidine kinase dhkC regulates the choice between migrating slugs and terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol*, **203**, 345-357.
- Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D. and Aravin, A.A. (2011) PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 246-258.
- Smardon, A., Spoerke, J.M., Stacey, S.C., Klein, M.E., Mackin, N. and Maine, E.M. (2000) EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol*, **10**, 169-178.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, **305**, 1434-1437.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Sriskanthadevan, S., Lee, T., Lin, Z., Yang, D. and Siu, C.H. (2009) Cell adhesion molecule DdCAD-1 is imported into contractile vacuoles by membrane invagination in a Ca²⁺- and conformation-dependent manner. *J Biol Chem*, **284**, 36377-36386.
- Stahlberg, A., Hakansson, J., Xian, X., Semb, H. and Kubista, M. (2004a) Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem*, **50**, 509-515.
- Stahlberg, A., Kubista, M. and Pfaffl, M. (2004b) Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clin Chem*, **50**, 1678-1680.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
- Steiz, T.A. (1998) A mechanism for all polymerases. *Nature*, **391**, 231-232.
- Stougaard, P., Molin, S. and Nordstrom, K. (1981) RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6008-6012.
- Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Moazed, D. and Grewal, S.I. (2005) RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 152-157.
- Sutoh, K. (1993) A transformation vector for *dictyostelium discoideum* with a new selectable marker bsr. *Plasmid*, **30**, 150-154.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. and Zamore, P.D. (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev*, **17**, 49-63.
- Tanzer, A. and Stadler, P.F. (2004) Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol*, **339**, 327-335.
- te Riele, H., Maandag, E.R. and Berns, A. (1992) Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5128-5132.
- Thon, G., Hansen, K.R., Altes, S.P., Sidhu, D., Singh, G., Verhein-Hansen, J., Bonaduce, M.J. and Klar, A.J. (2005) The Clr7 and Clr8 directionality factors and the Pcu4 cullin mediate heterochromatin formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, **171**, 1583-1595.

- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. and Zamore, P.D. (2004) A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, **306**, 1377-1380.
- Tomari, Y. and Zamore, P.D. (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev*, **19**, 517-529.
- Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G. and Som, T. (1981) Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 1421-1425.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P. and Sharp, P.A. (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*, **13**, 3191-3197.
- Urushihara, H. (2008) Developmental biology of the social amoeba: history, current knowledge and prospects. *Dev Growth Differ*, **50 Suppl 1**, S277-281.
- Vagin, V.V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V. and Zamore, P.D. (2006) A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, **313**, 320-324.
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A.C., Hilbert, J.L., Bartel, D.P. and Crete, P. (2004) Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Mol Cell*, **16**, 69-79.
- Veltman, D.M., Akar, G., Bosgraaf, L. and Van Haastert, P.J. (2009a) A new set of small, extrachromosomal expression vectors for Dictyostelium discoideum. *Plasmid*, **61**, 110-118.
- Veltman, D.M., Keizer-Gunnink, I. and Haastert, P.J. (2009b) An extrachromosomal, inducible expression system for Dictyostelium discoideum. *Plasmid*, **61**, 119-125.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I. and Moazed, D. (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, **303**, 672-676.
- Vervoort, E.B., van Ravestein, A., van Peij, N.N., Heikoop, J.C., van Haastert, P.J., Verheijden, G.F. and Linskens, M.H. (2000) Optimizing heterologous expression in dictyostelium: importance of 5' codon adaptation. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2069-2074.
- Voinnet, O. (2008) Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci*, **13**, 317-328.
- Voinnet, O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, **136**, 669-687.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. and Martienssen, R.A. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, **297**, 1833-1837.
- Wagner, A. (2000) Robustness against mutations in genetic networks of yeast. *Nat Genet*, **24**, 355-361.
- Wagner, E.G., Altuvia, S. and Romby, P. (2002) Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet*, **46**, 361-398.
- Walhout, A.J., Temple, G.F., Brasch, M.A., Hartley, J.L., Lorson, M.A., van den Heuvel, S. and Vidal, M. (2000) GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol*, **328**, 575-592.
- Wassenegger, M. and Krczal, G. (2006) Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci*, **11**, 142-151.
- Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Mise, K., Okuno, T., Sasaki, H., Minami, N. and Imai, H. (2006) Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev*, **20**, 1732-1743.

- Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., et al. (2008) Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, **453**, 539-543.
- Waters, L.S. and Storz, G. (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, **136**, 615-628.
- Watts, D.J. and Ashworth, J.M. (1970) Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J*, **119**, 171-174.
- Weijer, C.J., Duschl, G. and David, C.N. (1984) Dependence of cell-type proportioning and sorting on cell cycle phase in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci*, **70**, 133-145.
- Wetterauer, B., Jacobsen, G., Morandini, P. and MacWilliams, H. (1993a) Mutants of *Dictyostelium discoideum* with defects in the regulation of discoidin I expression. *Dev Biol*, **159**, 184-195.
- Wetterauer, B.W., Salger, K., Carballo-Metzner, C. and MacWilliams, H.K. (1995) Cell-density-dependent repression of discoidin in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation*, **59**, 289-297.
- Wetterauer, B.W., Salger, K. and MacWilliams, H.K. (1993b) Use of a transactive regulatory mutant of *Dictyostelium discoideum* in a eucaryotic expression system. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1397-1401.
- Wiegand, S. (2007) Klonierung und Charakterisierung von RNA abhängigen RNA-Polymerasen aus *Dictyostelium discoideum*. Diplomarbeit Abteilung Genetik, Universität Kassel.
- Wiegand, S., Kruse, J., Gronemann, S. and Hammann, C. (2011) Efficient generation of gene knockout plasmids for *Dictyostelium discoideum* using one-step cloning. *Genomics*, **97**, 321-325.
- Wienholds, E., Koudijs, M.J., van Eeden, F.J., Cuppen, E. and Plasterk, R.H. (2003) The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. *Nat Genet*, **35**, 217-218.
- Williams, K.L. and Newell, P.C. (1976) A genetic study of aggregation in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics*, **82**, 287-307.
- Witke, W., Nellen, W. and Noegel, A. (1987) Homologous recombination in the *Dictyostelium* alpha-actinin gene leads to an altered mRNA and lack of the protein. *Embo J*, **6**, 4143-4148.
- Wong, E., Yang, C., Wang, J., Fuller, D., Loomis, W.F. and Siu, C.H. (2002) Disruption of the gene encoding the cell adhesion molecule DdCAD-1 leads to aberrant cell sorting and cell-type proportioning during *Dictyostelium* development. *Development*, **129**, 3839-3850.
- Wu, L., Fan, J. and Belasco, J.G. (2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 4034-4039.
- Xie, Z., Allen, E., Wilken, A. and Carrington, J.C. (2005) DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12984-12989.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. and Carrington, J.C. (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, **2**, E104.
- Xie, Z. and Qi, X. (2008) Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim Biophys Acta*, **1779**, 720-724.
- Yang, N. and Kazazian, H.H., Jr. (2006) L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 763-771.

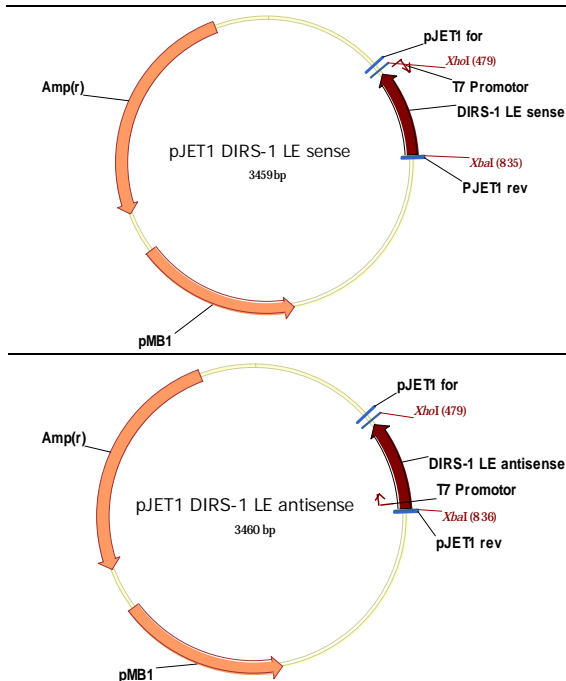
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. and Cullen, B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, **17**, 3011-3016.
- Yu, D., Fan, B., MacFarlane, S.A. and Chen, Z. (2003) Analysis of the involvement of an inducible Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact*, **16**, 206-216.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.
- Zeng, Y., Yi, R. and Cullen, B.R. (2003) MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9779-9784.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. and Filipowicz, W. (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, **118**, 57-68.
- Zhang, K., Mosch, K., Fischle, W. and Grewal, S.I. (2008) Roles of the Clr4 methyltransferase complex in nucleation, spreading and maintenance of heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 381-388.
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muirers, J.P. and Stewart, A.F. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli. *Nat Genet*, **20**, 123-128.
- Zilberman, D., Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, **299**, 716-719.
- Zuker, C., Cappello, J., Chisholm, R.L. and Lodish, H.F. (1983) A repetitive Dictyostelium gene family that is induced during differentiation and by heat shock. *Cell*, **34**, 997-1005.

13. Anhang

13.1. Plasmide

13.1.1. Vektoren zur Herstellung von Ribo Sonden

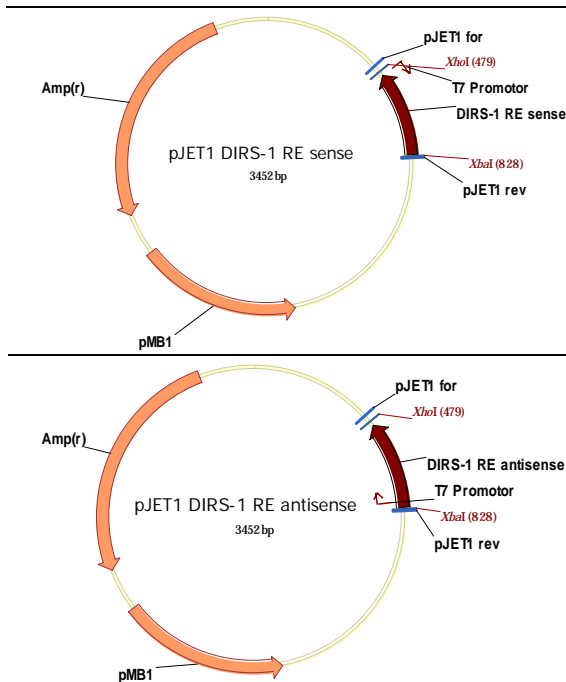
pJET1 DIRS-1 LE *sense* und pJET1 DIRS-1 LE *antisense*



Zur Generierung von strangspezifischen Sonden mittels *in vitro* Transkription für Northern Blot Analysen, wurde ein 310 bp langes Fragment LE am 5' Ende von ORF II (+41 – +351)^a kloniert. Die Amplifikation von genomischer DNA des Wildtyps AX2 mit angehängter T7 Promotorsequenz erfolgte mit den Primern #1526 / #1527 (*sense* Sonde) bzw. #1528 / #1529 (*antisense* Sonde). Nach Klonierung in den Vektor pJET1/blunt wurde durch Sequenzierung die Sequenz des Inserts validiert. Durch Restriktions-spaltung mit den Enzymen *Xba* I und *Xho* I wurde das DNA-Template für die *in vitro* Transkription generiert.

^a Positionsangabe relativ zur ersten Base von ORF II von DIRS-1 (GB: M11339.1 bzw. vgl. Abb. 9.14.).

pJET1 DIRS-1 RE *sense* und pJET1 DIRS-1 RE *antisense*

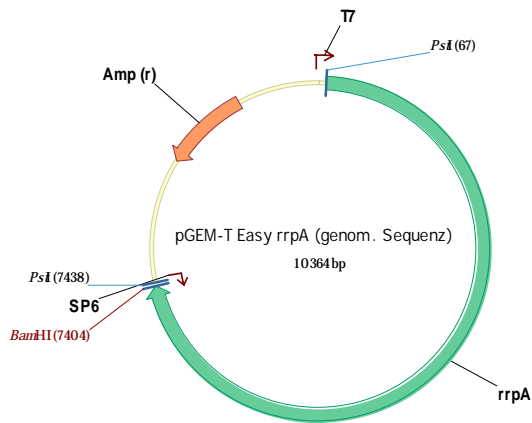


Zur Herstellung von strangspezifischen Sonden am 3' Ende von ORF II wurde analog zur Position LE mit den Primern #1522 / #1523 (*sense* Sonde) bzw. #1524 / #1525 (*antisense* Sonde) ein 301 bp langes Fragment RE des ORF II (+1535 – +1835)^a amplifiziert. Nach Klonierung in den Vektor pJET1/blunt wurde das Insert sequenziert.

^a Positionsangabe relativ zu ersten Base von ORF II von DIRS-1 (GB: M11339.1 bzw. vgl. Abb. 9.14.).

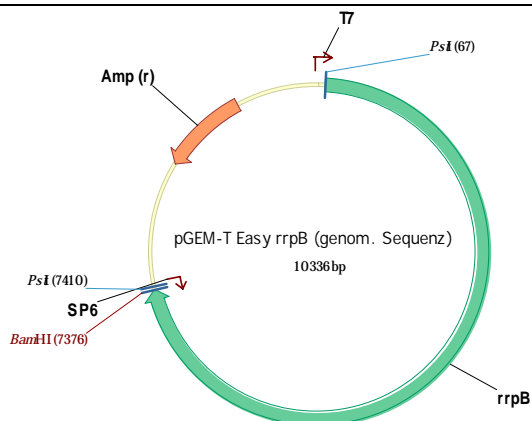
13.1.2. Klonierung der genomischen Sequenz der RdRPs

pGEM-T Easy *rrpA* (genomische Sequenz)



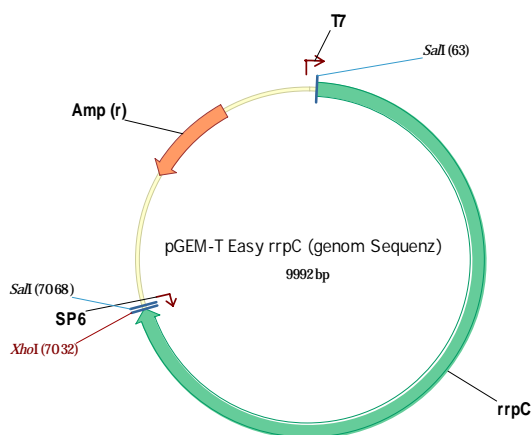
Die genomische Sequenz von *rrpA* wurde mit den Primern #1113 / #1114 von genomischer DNA des Wildtyps AX2 amplifiziert. Zur C-terminalen Fusion in einen Zielvektor der pDneo2a Serie (Dubin and Nellen, 2010), wurde in der Primersequenz das Stop Condon entfernt und am 5' Ende eine *Pst* I bzw. am 3' Ende eine *Bam* HI Schnittstelle eingefügt. Zur besseren Expression in *D. discoideum* wurde zwischen *Sal* I und Startcondon ein „A run“ (Kozak ähnliche Sequenz) durch zwei Adenosine eingefügt (Vervoort et al., 2000). Nach erfolgreicher Klonierung in den pGEM-T Easy Vektor wurde die vollständige Sequenz der RdRP durch Sequenzierungen bestätigt (vgl. Tab. 9.1.).

pGEM-T Easy *rrpB* (genomische Sequenz)



Analog zu *rrpA* wurde die genomische Sequenz von *rrpB* mit den Primern #1115 / #1116 amplifiziert und nachfolgend in den pGEM-T Easy Vektor kloniert und das Insert sequenziert (vgl. Tab. 9.1.). Wie bei *rrpA* sollte auch hier eine C-terminale Klonierung in einen Zielvektor der pDneo2a Serie erfolgen. Auch hier wurde in der Primersequenz ein „A run“ ergänzt, das Stop Condon entfernt und die gleichen Restriktionsschnittstellen wie bei der Klonierung von *rrpA* verwendet.

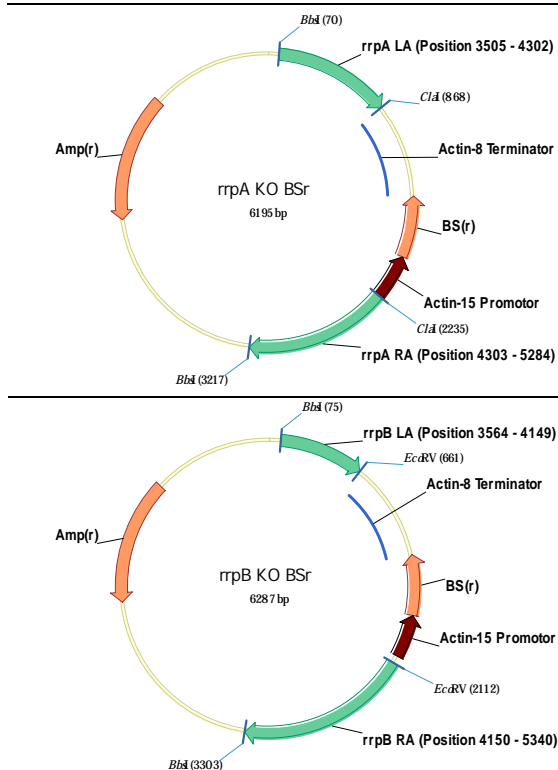
pGEM-T Easy *rrpC* (genomische Sequenz)



Die genomische Sequenz von *rrpC* wurde mit den Primern #1117 / #1118 von AX2 Wildtyp DNA amplifiziert und in den pGEM-T Easy Vektor kloniert und das Insert sequenziert (vgl. Tab. 9.1.). Für *rrpC* sollte jedoch eine N-terminale Klonierung in einen Zielvektor der pDneo2a Serie erfolgen. Daher wurde an die Primersequenz am 5' Ende eine *Sal* I und am 3' Ende eine *Xho* I Schnittstelle angehängt. Zur Aufrechterhaltung des Leserahmens wurde zwischen der *Sal* I Restriktionsschnittstelle und dem Startcondon ein Adenosin ergänzt.

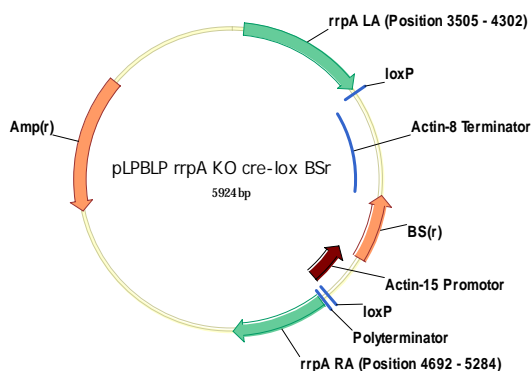
13.1.3. Vektoren zur Herstellung von RdRP *knock out* Stämmen

***rrpA* KO BS^(r) und *rrpB* KO BS^(r) (Martens et al., 2002)**



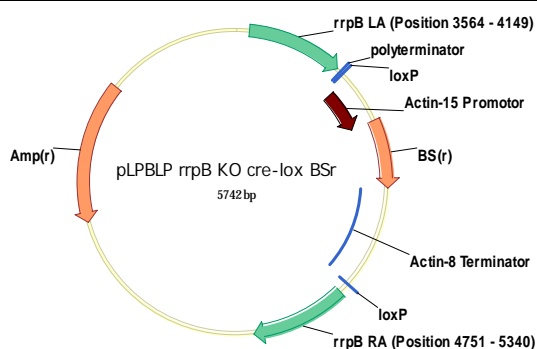
Zur Herstellung von *rrpA* und *rrpB* *knock out* Stämmen mittels homologer Rekombination wurde ein 1803 bp großer Bereich mit den Primern #1047 / #1048 von genomischer DNA des Wildtyps AX2 amplifiziert und dieses Fragment über die angehängten *Bbs*I Schnittstellen in einen pGEM Vektor kloniert. Durch Restriktions-spaltung mit *Cla*I für *rrpA* bzw. *EcoRV* für *rrpB* konnte die Integration der BS^(r) Expressionskassette (Sutoh, 1993) in diese Position erfolgen. Hierdurch wurden für *rrpA* und *rrpB* spezifische Fragmente des rechten und linken Arm erreicht. Die hieraus resultierenden *knock out* Vektoren *rrpA* KO BS^(r) und *rrpB* KO BS^(r) erzeugen keine Deletion im Gen und enthalten keine *loxP sites* zur Entfernung der BS^(r) Kassette. (Details vgl. Tab. 9.2.).

pLPBLP *rrpA* KO cre-lox BS^(r) (S. Kasten, Universität Kassel, unveröffentlicht)



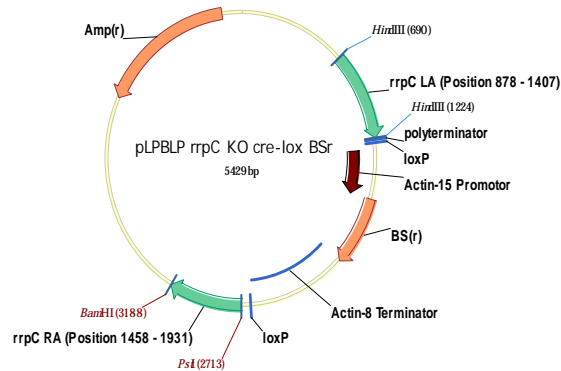
Um RdRP *double* und *triple knock out* Stämme herstellen zu können, wurde ausgehend vom Vektor *rrpA* KO BS^(r) der Vektor pLPBLP *rrpA* KO cre-lox BS^(r) generiert, der *loxP sites* zur Entfernung der BS^(r) Kassette enthält. Durch Verdau des Vektors *rrpA* KO BS^(r) mit *Mun*I und *Cla*I wurden BS^(r) Kassette und Teile des rechten Arms entfernt. Nachfolgend wurde in einer *blunt end* Ligation die BS^(r) Kassette mit *loxP sites*, welche aus dem Vektor pLPBLP durch *Sma*I Verdau herausgeschnitten wurde, integriert (Details vgl. Tab 9.2.).

pLPBLP *rrpB* KO cre-lox BS^(r) (S. Fuhrmann, Universität Kassel, unveröffentlicht)



Analog zum Vektor pLPBLP *rrpA* KO cre-lox BS^(r) wurde der Vektor *rrpB* KO cre-lox BS^(r) erstellt. Hierzu konnte der Vektor *rrpB* KO BS^(r) mit *Mun*I und *Hind*III verdaut werden, wodurch auch hier Teile des rechten Arms und die BS^(r) Kassette entfernt wurde. Auch hier wurde eine BS^(r) Kassette mit *loxP sites* aus dem Vektor pLPBLP in einer *blunt end* Ligation integriert (Details vgl. Tab 9.2.).

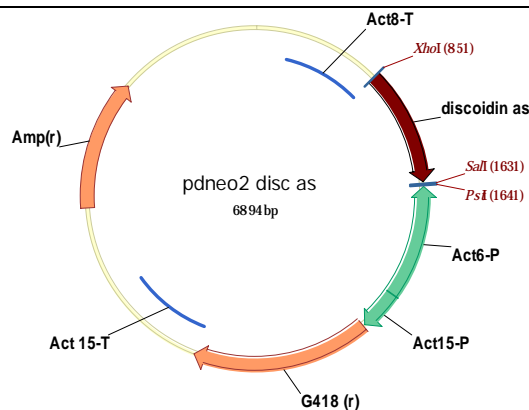
pLPBLP rrpC KO cre-lox BS^(r) (S. Kasten, Universität Kassel, unveröffentlicht)



Zur Herstellung von *rrpC knock out* Stämmen mit dem pLPBLP Vektorsystem (Faix et al., 2004) wurde der Vektor pLPBLP rrpC KO cre-lox BS^(r) generiert. Hierzu wurden rechter Arm (Primer #1051 / #1052) und linker Arm (Primer #1050 / #1053) getrennt von genomischer DNA aus Wildtyp AX2 amplifiziert. Nachfolgend konnte zunächst der linke Arm über die angehängten *Hind* III Schnittstellen, gefolgt vom rechten Arm über die *Pst* I und *Bam* HI Schnittstellen in den Vektor pLPBLP kloniert werden (Details vgl. Tab 9.2.).

13.1.4. Discoidin Reportersystem

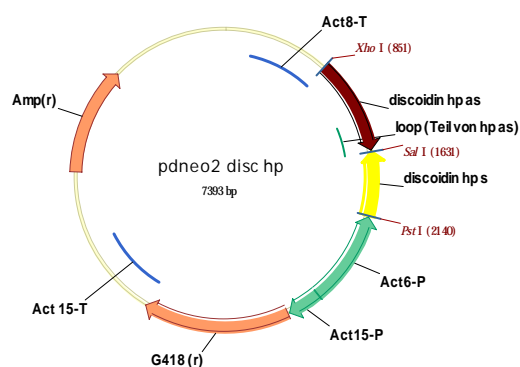
pDneo2 disc as (Popova et al., 2006)



Der Vektor pDneo2 disc as beinhaltet die genomische Sequenz von *dscC-1*^a (*Discoidin gamma subunit*) in reverser Orientierung relativ zum Actin6 Promotor des pDneo2 Vektors (Witke et al., 1987). Teilbereiche des Inserts wurden durch Sequenzierung verifiziert. (Details zur Klonierung vgl. Popova et al., 2006).

^a *dscC-1* (DDB_G0273065)

pDneo2 disc hp (Martens et al., 2002)

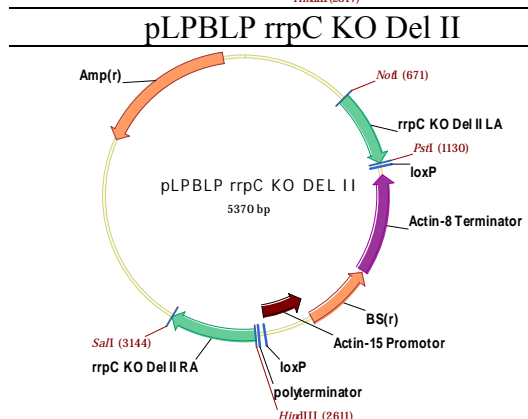
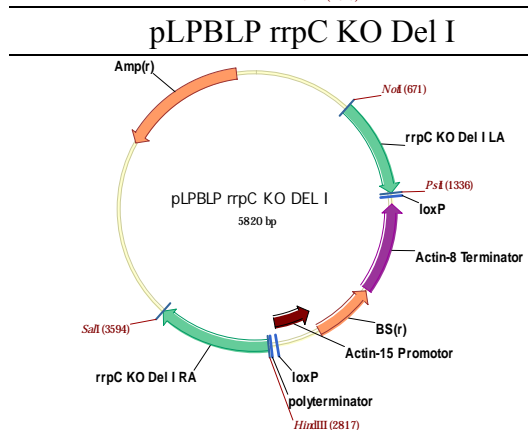
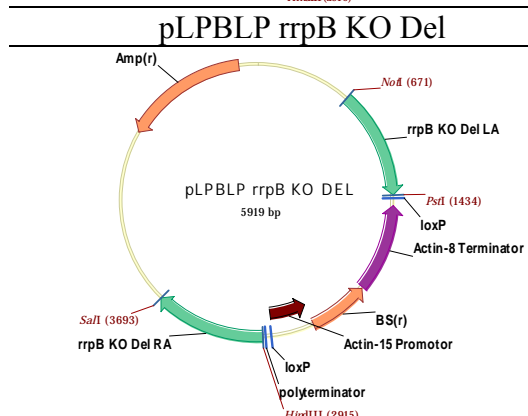
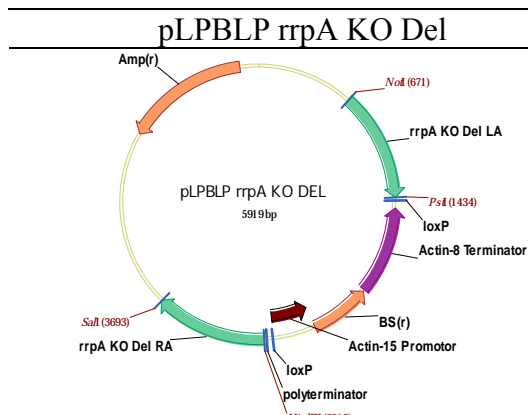


Das Discoidin *hairpin* Konstrukt im Vektor pDneo2 disc hp wurde ebenfalls basierend auf der genomischen Sequenz von *dscC-1*^a erstellt. Das resultierende *hairpin* besteht aus einem 509 bp langen doppelsträngigen Bereich und einem 259 bp großen *loop* Bereich. Teilbereiche des *hairpin* Konstrukts konnten auch hier durch Sequenzierung verifiziert werden. (Details zur Klonierung vgl. Martens et al. 2002).

^a *dscC-1* (DDB_G0273065)

13.1.5. Vektoren zur Herstellung von RdRP Deletionsstämmen

pLPBLP RdRP KO Del Vektoren (Wiegand et al., 2011)



Zur Klonierung von pLPBLP RdRP KO Del Vektoren wurden für alle Konstrukte jeweils linker Arm (LA) und rechter Arm (RA) von den Vektoren pGEM-T Easy rrpA / rrpB / rrpC (vgl. 13.1.2.) amplifiziert. Die hierfür verwendeten Primer wurden in Tabelle 13.1. aufgeführt. Zunächst wurden die PCR-Produkte in den pGEM-T Easy Vektor kloniert und die Sequenz der Arme durch Sequenzierung bestätigt. Nachfolgend konnten die jeweils rechten Arme über die angehängten Schnittstellen (5' *Hind* III und 3' *Sal* I) in den leeren pLPBLP Vektor kloniert werden. Nach Verifizierung der resultierenden pLPBLP Vektoren mit rechtem Arm konnten die entsprechenden linken Arme über die angefügten 5' *Not* I und 3' *Pst* I Schnittstellen in diese Vektoren kloniert werden. Hieraus resultieren die fertigen pLPBLP Vektoren zur Herstellung von RdRP *knock out* Deletionsstämmen. Diese Plasmide konnten vor der Transformation in *D. discoideum* mit den Restriktionsenzymen *Not* I / *Sal* I gespalten werden.

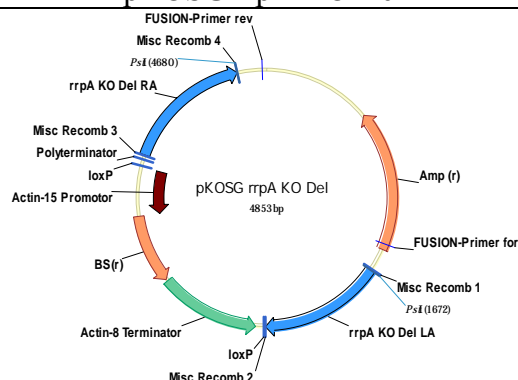
Tab. 13.1.: Primer zur Amplifikation von linken und rechten Arm zur Klonierung von pLPBLP Vektoren für RdRP *knock out* Deletionstämmen.

Arm ^a	Primer	erwartete Amplifikatgröße [bp]
rrpA KO Del LA	#0022 / #0023	766
rrpA KO Del RA	#0024 / #0025	784
rrpB KO Del LA	#0022 / #0023	766
rrpB KO Del RA	#0527 / #0025	784
rrpC KO Del I LA	#0026 / #0027	668
rrpC KO Del I RA	#0028 / #0029	783
rrpC KO Del II LA	#0529 / #0530	462
rrpC KO Del II RA	#0531 / #0532	539

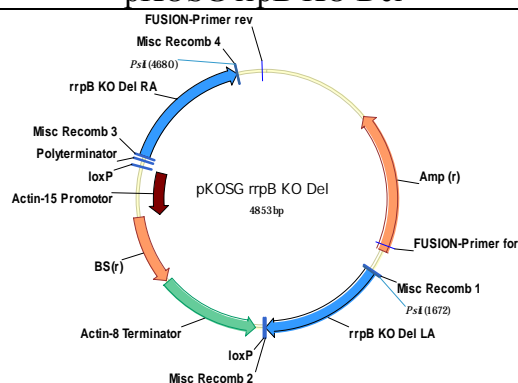
^a Positionen der Arme im Gen sind in Tabelle 9.8. aufgeführt.

pKOSG RdRP KO Del Vektoren (Wiegand et al., 2011)

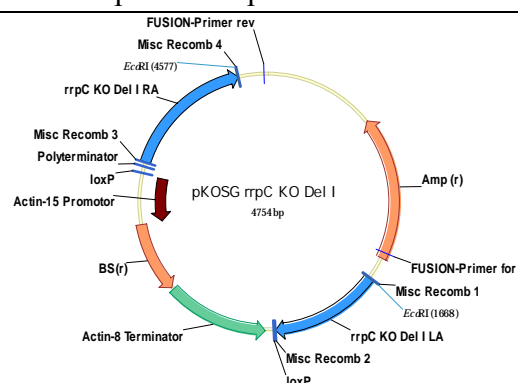
pKOSG rrpA KO Del



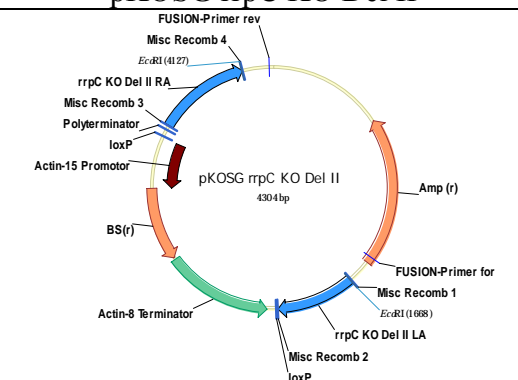
pKOSG rrpB KO Del



pKOSG rrpC KO Del I



pKOSG rrpC KO Del II



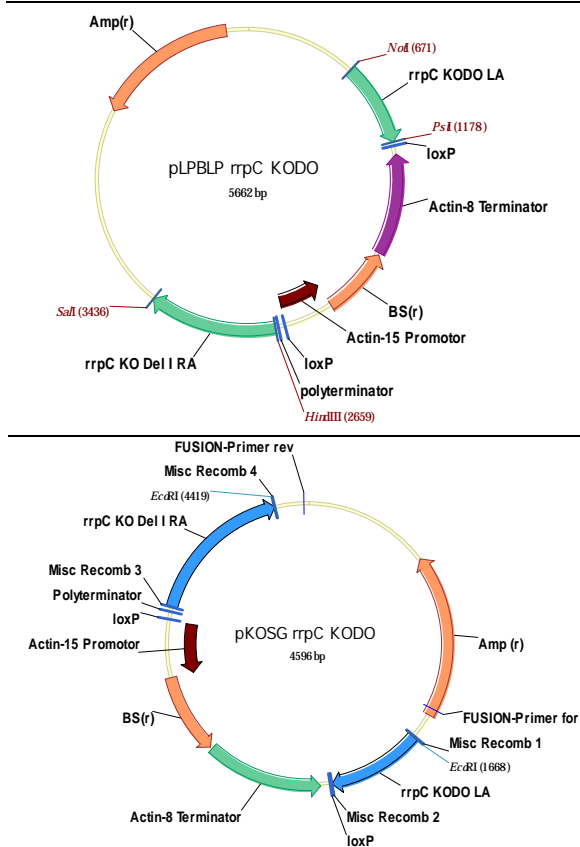
Die aufgeführten pKOSG RdRP KO Del Vektoren wurden durch *combinatorial cloning* mit dem pKOSG System generiert (vgl. Abschnitt 9.4.). Dazu wurden auch hier jeweils linker und rechter Arm mit angehängten *combinatorial sites* von den Vektoren pGEM-T Easy rrpA / rrpB / rrpC (vgl. 13.1.2.) unter Verwendung der in Tabelle 13.2. angegebenen Primer amplifiziert. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurde diese, wie in Abschnitt 8.3.9. beschrieben, in den Reaktionsansatz eingesetzt. Die erhaltenen Klone konnten mittels Plasmidminipräparation analysiert werden. Dabei wurden die Plasmide durch Restriktionsspaltung, mit den in die Primersequenz eingefügten Restriktionsschnittstellen (*Pst* I für rrpA / rrpB KO Del bzw. *Eco* RI für rrpC KO Del I / II) analysiert. Bei korrekt verdauten Klonen wurde die Sequenz von linkem bzw. rechtem Arm durch Sequenzierung mit den Primern #0163 / #0164 bestätigt. Auch hier wurden die Plasmide vor dem Einsatz in Transformationen in *D. discoideum* mit den in die Primersequenz integrierten Schnittstellen gespalten.

Tab. 13.2.: Primer zur Amplifikation von linken und rechten Arm zur Klonierung von pKOSG Vektoren für RdRP *knock out* Deletionstämmen.

Arm ^a	Primer	erwartete Amplifikatgröße [bp]
rrpA KO Del LA	#0047 / #0048	788
rrpA KO Del RA	#0049 / #0050	808
rrpB KO Del LA	#0047 / #0048	788
rrpB KO Del RA	#0528 / #0050	808
rrpC KO Del I LA	#0051 / #0052	690
rrpC KO Del I RA	#0053 / #0054	807
rrpC KO Del II LA	#0533 / #0534	484
rrpC KO Del II RA	#0535 / #0536	563

^a Positionen der Arme im Gen wurden in Tabelle 9.8. aufgeführt.

pLPBLP rrpC KODO und pKOSG rrpC KODO

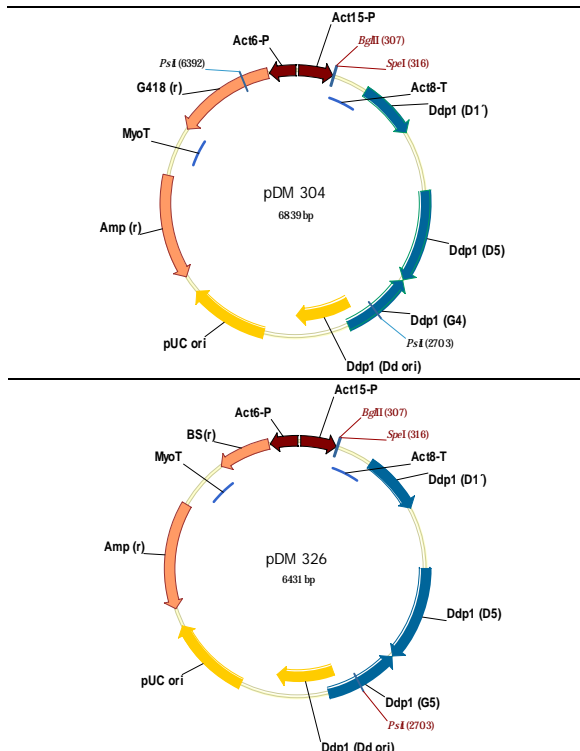


Die Klonierung des Vektors pLPBLP rrpC KODO erfolgte wie für den Vektor pLPBLP rrpC KO Del I beschrieben, jedoch wurde als linker Arm ein 510 bp großes Fragment, welches mit den Primer #0537 / #0538 amplifiziert wurde, verwendet. Der eingesetzte rechte Arm rrpC KO Del I RA wurde nicht verändert (vgl. Tab 13.1.).

Die Herstellung des Vektors pKOSG rrpC KODO mittels pKOSG System erfolgte analog zum Vektor pKOSG rrpC KO Del I. Als linker Arm wurde ein 532 bp großes Fragment, welches mit den Primer #0539 / #0540 amplifiziert wurde, eingesetzt. Als rechter Arm konnte auch hier rrpC KO Del I RA (vgl. Tab. 13.2.) verwendet werden.

13.1.6. Extrachromosomale Vektoren für *D. discoideum*

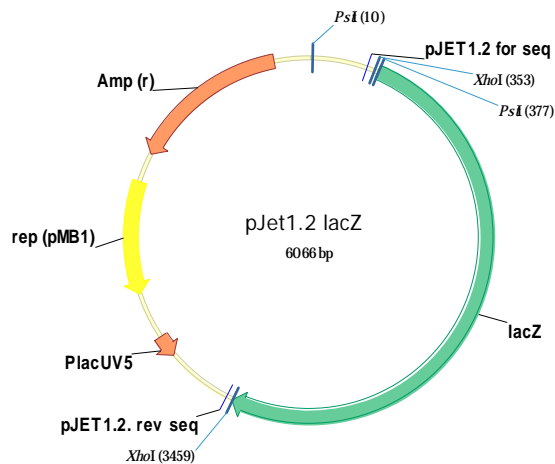
pDM304 und pDM326 (Veltman et al., 2009)



Die Vektoren pDM304 und pDM326 wurden zur Expression für *sense*, *antisense* und *hairpin* Konstrukte in den CadA und β -Gal Reportersystemen eingesetzt. Diese extrachromosomalen Expressionsvektoren für *D. discoideum* sind identisch im Aufbau, unterschieden sich aber in den jeweils vermittelten Resistenzen für *D. discoideum*. Der Vektor pDM304 vermittelt Geneticin-Resistenz und der Vektor pDM326 Blasticidin-Resistenz. Die Klonierung der jeweiligen Konstrukte in diese Vektoren erfolgte über die *Bgl* II / *Spe* I Schnittstellen in der Expressionskassette. Ein Verdau mit *Pst* I ermöglichte eine Unterscheidung zwischen den beiden Plasmiden (Details vgl. Veltman et al. 2009).

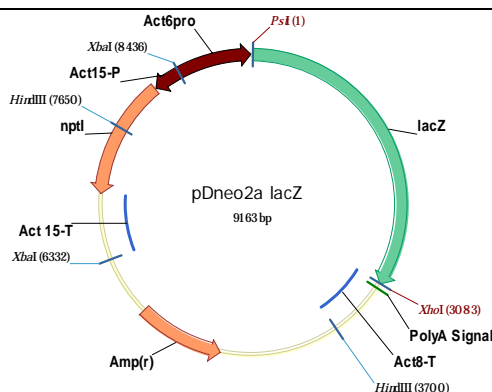
13.1.7. β -Gal Reportersystem

pJET1.2 *lacZ*



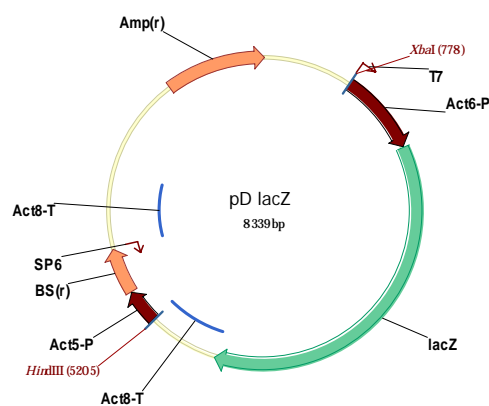
Für das β -Gal Reportersystem wurde die kodierende Sequenz des *lacZ* Gens aus *E. coli* mit den Primern #0182 / #0183 vom Vektor pET-14b *lacZ* (Science Bridge e.V.; Universität Kassel) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde zunächst in den Vektor pJET1.2/blunt kloniert und die Sequenz des *lacZ* Gens durch Sequenzierung verifiziert werden. Zur Klonierung der β -Galactosidase in den Vektor pDneo2a wurde am 5' Ende eine *Pst* I und am 3' Ende eine *Xho* I Schnittstelle angefügt. Zur besseren Expression in *D. discoideum* wurde zwischen *Pst* I und Startcondon ein „A run“ (Kozak ähnliche Sequenz) durch 5 Adenosine eingefügt (Vervoort et al., 2000). Das Stopcodon wurde nicht entfernt. Die vollständige Sequenz des *lacZ* Gens wurde durch Sequenzierung bestätigt

pDneo2a *lacZ*



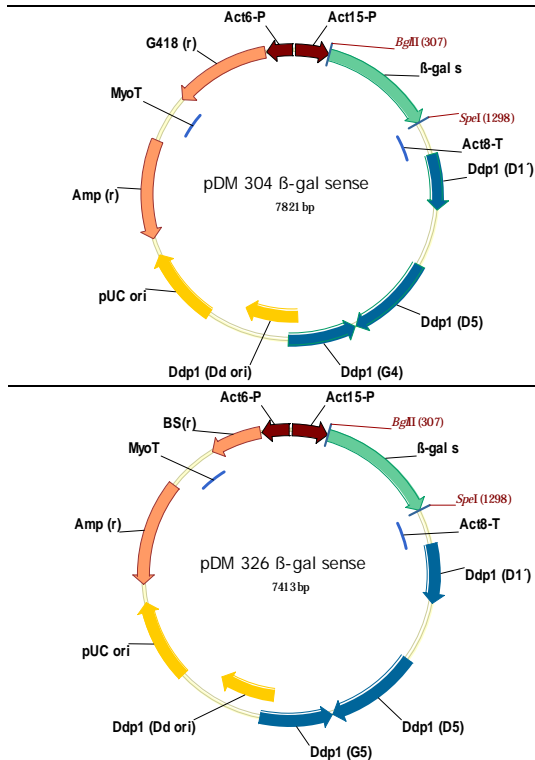
Zur Herstellung eines *lacZ* Expressionsvektors für *D. discoideum* mit Geniticin-Resistenz wurde die kodierende Sequenz der β -Galactosidase durch *Pst* I / *Xho* I Verdau aus dem Vektor pJET1.2 *lacZ* heraus gespalten und in den Vektor pDneo2a (Dubin and Nellen, 2011), welcher zuvor mit den selben Restriktionsenzymen geschnitten wurde, kloniert. Eine erneute Sequenzierung des *lacZ* Gens erfolgte in diesem Fall nicht.

pD *lacZ*



Um einen *lacZ* Expressionsvektor für *D. discoideum* mit Blasticidin-Resistenz generieren zu können, wurde zunächst aus dem Vektor pD BS^(r) (Pang et al.; 1999) die Expressionskassette durch *Xba* I / *Hind* III Verdau heraus gespalten. Nachfolgend konnte die *lacZ* Expressionskassette aus dem Vektor pDneo2a *lacZ* durch *Xba* I / *Hind* III Verdau entnommen werden und in den modifizierten pD Vektor kloniert werden. Eine erneute Sequenzierung des Inserts wurde auch in diesem Fall nicht durchgeführt.

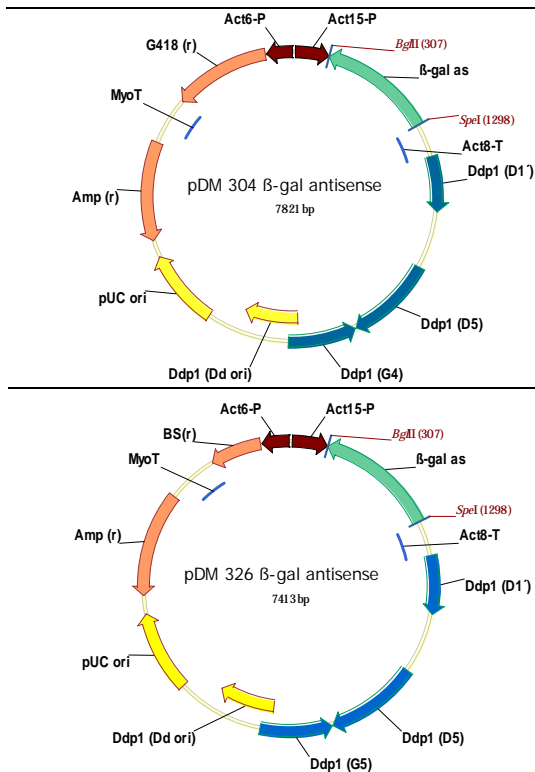
pDM304 β -gal *sense* und pDM326 β -gal *sense*



Für das β -gal *sense* Konstrukt in den Vektoren pDM304 β -gal *sense* und pDM326 β -gal *sense* wurde mit den Primern #1196 / #1197 ein 985 bp großes Fragment (+1143 – +2127)^a, der kodierenden Sequenz von *lacZ* vom Vektor pJET1.2 *lacZ*, amplifiziert. Nach Klonierung und Sequenzierung des Inserts im pGEM-T Easy Vektor, erfolgte über die angefügten 5' *Bgl* II bzw. 3' *Spe* I Schnittstellen eine gerichtete Klonierung des *sense* Konstrukts in die Vektoren pDM304 und pDM326 erfolgen. Eine erneute Sequenzierung der Inserts nach diesen Umklonierungen ohne PCR Zwischenschritt erfolgte nicht (Details vgl. Abb. 9.29.).

^a Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Startcodon der kodierenden Sequenz von *lacZ*.

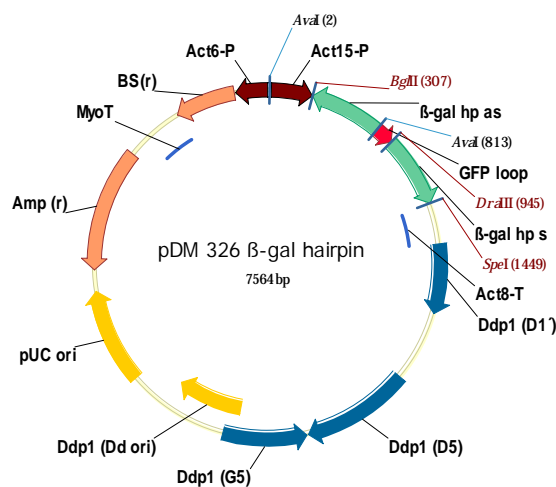
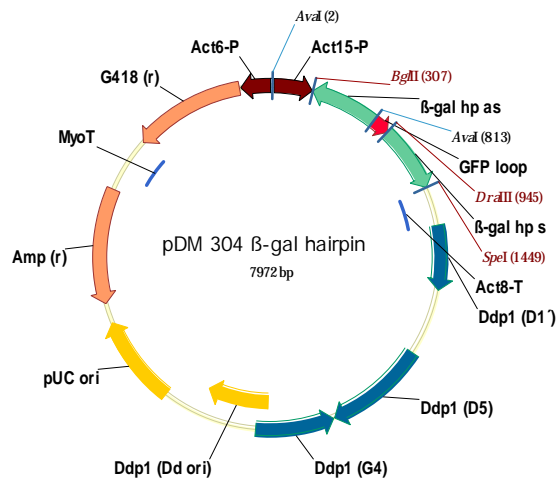
pDM304 β -gal *antisense* und pDM326 β -gal *antisense*



Analog zur Klonierung des β -gal *sense* Konstrukts wurde auch für das β -gal *antisense* Konstrukt ein 985 bp großes Fragment (+1143 – +2127)^a mit den Primern #0190 / #0191 vom Plasmid pJET1.2 *lacZ* amplifiziert und nach Klonierung in den pGEM-T Easy Vektor auch hier die Sequenz des Inserts durch Sequenzierung bestätigt. Über die im Vergleich zum β -gal *sense* Konstrukt gespiegelten Positionen der angehängten *Bgl* II / *Spe* I Schnittstellen, erfolgte eine gerichtete Klonierung in reverser Orientierung (relativ zum *lacZ* Startcodon) in die Vektoren pDM304 und pDM326. Eine erneute Sequenzierung der Inserts nach dieser Umklonierungen ohne PCR Zwischenschritt erfolgte nicht (Details vgl. Abb. 9.29.).

^a Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Startcodon der kodierenden Sequenz von *lacZ*.

pDM304 β -gal *hairpin* und pDM326 β -gal *hairpin*



Für die Klonierung des β -gal *hairpins* wurden zunächst β -gal *sense* und β -gal *antisense* Fragment mit den in Tabelle 13.3. angegebenen Primern und angefügten Schnittstellen vom Vektor pJET1.2 *lacZ* amplifiziert und die PCR-Produkte in den Vektor pGEM-T Easy kloniert. Das GFP *loop* Fragment mit angehängten Schnittstellen wurde vom Vektor pDneo2a GFP (Dubin and Nellen, 2010) amplifiziert (vgl. Tab. 13.3.). Nachfolgend wurde das β -gal *antisense* Fragment im pGEM-T Easy Vektor durch *Spe* I und *Ava* I (endogene Schnittstelle im β -gal *antisense* Fragment) gespalten, wodurch ein 162 bp großes Fragment am 5' Ende (relativ zum *lacZ* Startcodon) entfernt wurde. In diese Position konnte dann direkt das PCR-Produkt des GFP *loops*, welches mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten wurde, kloniert werden. Die Sequenz von *sense* und *antisense* Fragment mit GFP *loop* im Vektor pGEM-T Easy wurden durch Sequenzierung bestätigt.

Nun wurde der β -gal *antisense* Bereich mit GFP *loop* über die *Bgl* II / *Spe* I Schnittstellen in reverser Orientierung (relativ zum β -gal Startcodon) in den Vektor pDM304 kloniert. Nach Verifizierung dieses Schritts durch Restriktionsspaltungen konnte abschließend dieser Vektor mit *Dra* III und *Spe* I gespalten werden und das *sense* Fragment an diese Position gerichtet kloniert werden.

Durch *Bgl* II / *Spe* I Verdau wurde das β -gal *hairpin* Konstrukt aus dem Vektor pDM304 heraus gespalten und in den Vektor pDM326 kloniert. Eine erneute Sequenzierung der Inserts nach diesen Umklonierungen ohne PCR Zwischenschritt erfolgte nicht (Details vgl. Abb. 9.29.).

Tab. 13.3.: Primer zur Amplifikation der Fragmente zur Klonierung des β -gal *hairpin* Konstrukts.

Fragment	Position ^a	Primer	Größe ^b [bp]	Schnittstellen ^c	
				5' Ende	3' Ende
β -gal <i>hairpin sense</i>	+1359 – +1858	#0184 / #0185	515	<i>Dra</i> III	<i>Spe</i> I
β -gal <i>hairpin antisense</i>	+1200 – +1858	#0186 / #0187	674	<i>Spe</i> I und <i>Dra</i> III	<i>Bgl</i> II
GFP <i>loop</i>	---	#0188 / #0189	148	<i>Ava</i> I	<i>Dra</i> III und <i>Spe</i> I

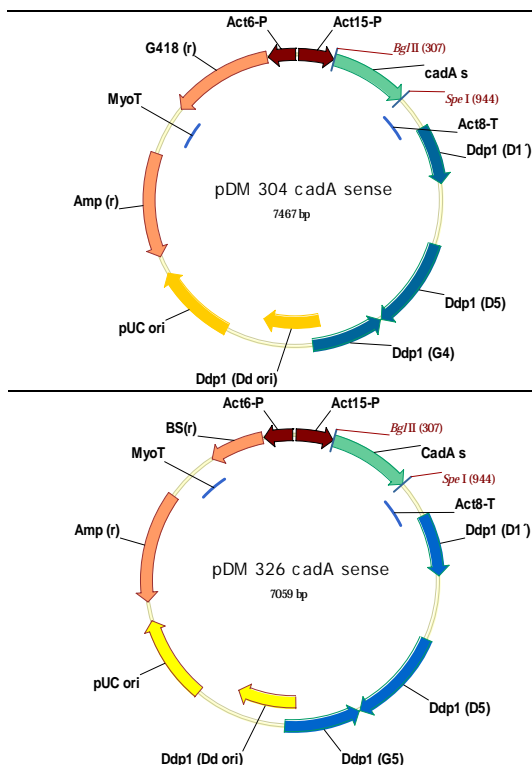
^a Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Startcodon der kodierenden Sequenz von *lacZ*.

^b Erwartete Größen der PCR-Produkte mit angehängten Restriktionsschnittstellen.

^c Positionsangabe relativ zum ATG Startcodon der kodierenden Sequenz von *lacZ* bzw. GFP.

13.1.8. CadA Reportersystem

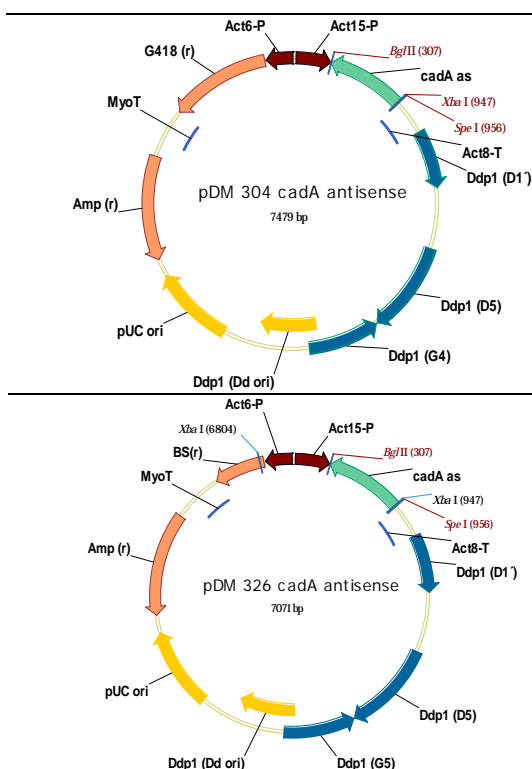
pDM304 *cadA sense* und pDM326 *cadA sense*



Für die Vektoren pDM304 *cadA sense* und pDM326 *cadA sense* wurde mit den Primern #1194 / #1195 ein 631 bp großes Fragment (+4 – +634)^a von AX2 cDNA amplifiziert. Nach Klonierung und Sequenzierung des Inserts im pGEM-T Easy Vektor, erfolgte über die angefügten 5' *Bgl* II bzw. 3' *Spe* I Schnittstellen eine gerichtete Klonierung des *sense* Konstrukts in den Vektor pDM304 und pDM326. Eine erneute Sequenzierung der Inserts nach diesen Umklonierungen ohne PCR Zwischenschritt erfolgte nicht (Details vgl. Abb. 9.22.).

^a Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Startcodon der kodierenden Sequenz von *cadA*.

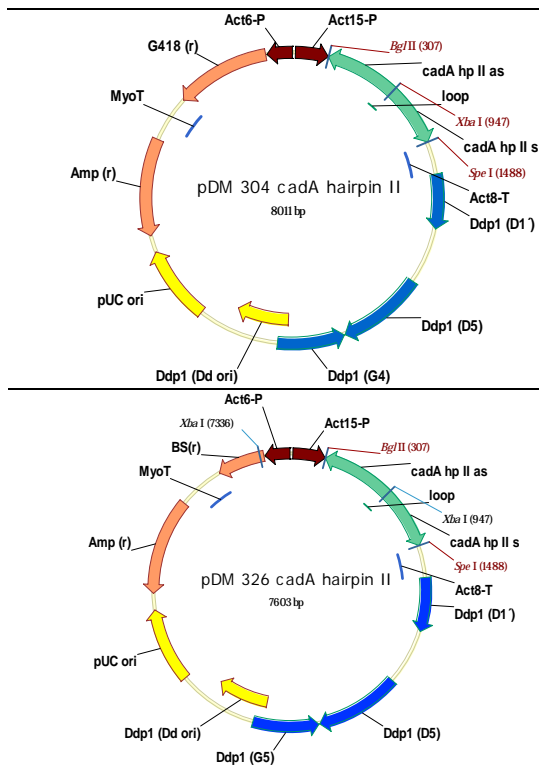
pDM304 *cadA antisense* und pDM326 *cadA antisense*



Zur Herstellung des *cadA antisense* und *hairpin II* Konstrukts wurde ein 634 bp großes Fragment (+1 – +634)^a mit den Primern #1015 / #1016 von AX2 cDNA amplifiziert und zunächst in den pGEM-T Easy Vektor kloniert. Nach Verifizierung des Inserts mittels Sequenzierung erfolgte über die angehängten *Bgl* II / *Spe* I Schnittstellen eine gerichtete Klonierung in reverser Orientierung (relativ zum ATG Startcondon von *CadA*) in den Vektor pDM304 und pDM326. Um diese Vektoren zur Klonierung des *hairpin II* Konstrukts nutzen zu können, wurde zusätzlich eine *Xba* I Schnittstelle integriert. Eine erneute Sequenzierung der Inserts nach diesen Umklonierungen ohne PCR Zwischenschritt erfolgte nicht (Details vgl. Abb. 9.22.).

^a Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Startcodon der kodierenden Sequenz von *cadA*.

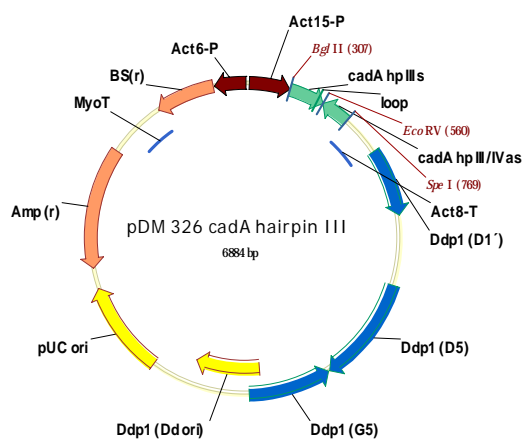
pDM304 *cadA hairpin II* / pDM326 *cadA hairpin II*



Zur Klonierung des *hairpin II* Konstrukts wurde von AX2 cDNA ein 535 bp großes *sense* Fragment (+100 – +634^a; Primer #1387 / #1388) amplifiziert und auch hier zunächst in den Vektor pGEM-T Easy kloniert und das Insert sequenziert. Dieses *sense* Fragment des *hairpin II* wurde dann über die angehängten *Xba I* / *Spe I* Schnittstellen gerichtet in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor pDM304 *cadA antisense* kloniert. Hieraus resultierte das *cadA hairpin II* Konstrukt im Vektor pDM304. Nachfolgend wurde das *hairpin II* Konstrukt durch *Bgl II* / *Spe I* Verdau heraus gespalten und in den Vektor pDM326 kloniert. Eine erneute Sequenzierung der Inserts nach dieser Umklonierungen ohne PCR Zwischenschritt erfolgte nicht (Details vgl. Abb. 9.22.).

^a Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Startcodon der kodierenden Sequenz von *cadA*.

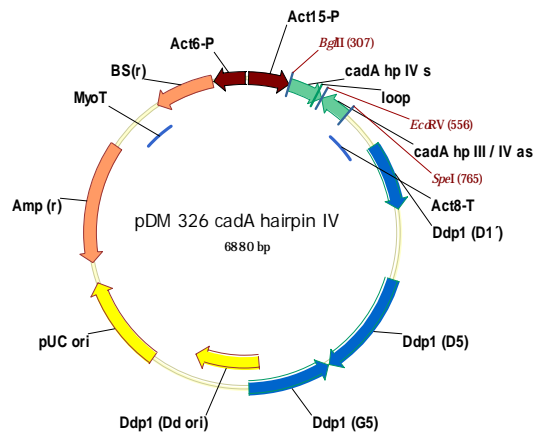
pDM326 *cadA hairpin III*



Zur Herstellung des *cadA hairpin III* wurden ein 245 bp großes *sense* Fragment (+1 – +245^a; Primer #1489 / #1490; mit angehängter 5' *Bgl II* und 3' *Eco RV* gefolgt von *Spe I* Schnittstelle) und ein 205 bp großes *antisense* Fragment (+1 – +205^a; Primer #1491 / #1492; mit angehängter *Eco RV* und *Spe I* Schnittstelle) von AX2 cDNA amplifiziert. Nach Klonierung in den pGEM-T Easy Vektor, wurde die Sequenz mittels Sequenzierung verifiziert. Das *sense* Fragment konnte dann über die *Bgl II* / *Spe I* Schnittstellen in den Vektor pDM326 kloniert werden. Abschließend erfolgte die ebenfalls gerichtete Klonierung des *antisense* Fragments über die angefügten *Eco RV* / *Spe I* Schnittstellen in reverser Orientierung (relativ zum ATG Startcodon von *cadA*), woraus der Vektor pDM 326 *cadA hairpin III* resultiert. Eine erneute Sequenzierung der Inserts nach diesen Umklonierungen ohne PCR Zwischenschritt erfolgte nicht (Details vgl. Abb. 9.22.).

^a Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Startcodon der kodierenden Sequenz von *cadA*.

pDM326 *cadA hairpin IV*



Die Klonierung des Vektors pDM326 *cadA hairpin IV* erfolgte analog zur Herstellung des Vektors pDM326 *cadA hairpin III*. Hierbei wurde jedoch ein 241 bp großes *sense* Fragment (+5 – +245)^a mit den Primern #1612 / #1490 von AX2 cDNA amplifiziert. Im Unterschied zum *sense* Fragment von *hairpin III*, welches mit dem ATG Startcodon beginnt, wurden bei diesem *sense* Fragment die ersten 4 Basen der kodierenden Sequenz von *cadA* entfernt. Die folgenden Klonierungsschritte, die verwendeten Schnittstellen und das eingesetzte *antisense* Fragment sind identisch zum Vektor pDM326 *cadA hairpin III* (Details vgl. Abb. 9.22.).

^a Start- und Endnukleotid relativ zum ATG Startcodon der kodierenden Sequenz von *cadA*.

13.2. Verwendete Primer zur Analyse potentieller RdRP KO Stämme

Tab. 13.4.: Verwendete Primer und erwartete Fragmente zur Analyse potentieller RdRP KO Stämme.^a

Gen	verwendeter RdRP <i>knock out</i> Vektor	Entfernung der BS ^(r) Kassette	Primer	erwartetes Signal	erwartete Amplifikatgröße [bp]
<i>rrpA</i>	<i>rrpA</i> KO BS ^(r)	–	#1049 / #1046	Wildtyp	1896
		–	#1049 / #0222	<i>knock out</i>	3263
		–	#0221 / #1046	linker Arm	1864
	pLPBLP <i>rrpA</i> KO cre-lox BS ^(r)	–	#0221 / #1046	rechter Arm	1421
		–	#1049 / #1046	Wildtyp	1896
		–	#1049 / #0222	<i>knock out</i>	2992
<i>rrpB</i>	<i>rrpB</i> KO BS ^(r)	–	#1049 / #0222	linker Arm	1929
		–	#0221 / #1046	rechter Arm	1085
		–	#1049 / #1046	Wildtyp	1893
	pLPBLP <i>rrpB</i> KO cre-lox BS ^(r)	–	#1049 / #0222	<i>knock out</i>	3344
		–	#0221 / #1046	linker Arm	1693
		–	#0221 / #1046	rechter Arm	1673
<i>rrpC</i>	pLPBLP <i>rrpC</i> KO cre-lox BS ^(r)	–	#1049 / #1046	Wildtyp	1893
		–	#1049 / #0221	<i>knock out</i>	2799
		–	#0222 / #1046	linker Arm	1054
	pLPBLP <i>rrpC</i> KO cre-lox BS ^(r)	–	#0222 / #1046	rechter Arm	1767
		–	#1070 / #1069	Wildtyp	1316
		–	#1070 / #0221	<i>knock out</i>	2754
<i>rrpA</i>	pLPBLP <i>rrpA</i> KO cre-lox BS ^(r)	–	#1049 / #1046	linker Arm	1040
<i>rrpB</i>	pLPBLP <i>rrpB</i> KO cre-lox BS ^(r)	–	#0222 / #1069	rechter Arm	1736
<i>rrpC</i>	pLPBLP <i>rrpC</i> KO cre-lox BS ^(r)	–	#1049 / #1046	entfernte BS ^(r)	1592
		+	#1049 / #1046	entfernte BS ^(r)	1398
		+	#1070 / #1069	entfernte BS ^(r)	1354

^a Details zur Analyse der potentiellen RdRP *knock out* Stämme siehe Abschnitt 9.3.1.

Tab. 13.5.: Verwendete Primer und erwartete Fragmente zur Analyse potentieller RdRP Deletionsstämme.^a

Gen	Verwendeter RdRP <i>knock out</i> Vektor	Entfernung der BS ^(r) Kassette	Primer	erwartetes Signal	erwartete Amplifikatgröße [bp]	erwartete Fragmente Eco RV Verdau [bp]
<i>rrpA</i>	pLPBLP <i>rrpA</i> KO Del	–	#1049 / #1046	Wildtyp	1896	621, 715, 560
		–	#0030 / #0222	linker Arm	1890	–
		–	#0221 / #0031	rechter Arm	1256	–
	pKOSG <i>rrpA</i> KO Del	–	#1049 / #1046	Wildtyp	1896	621, 715, 560
		–	#0030 / #0325	linker Arm	856	–
		–	#0221 / #0031	rechter Arm	1260	–
<i>rrpB</i>	pLPBLP <i>rrpB</i> KO Del	–	#1049 / #1046	Wildtyp	1893	1272, 621
		–	#0030 / #0222	linker Arm	1890	–
		–	#0221 / #0031	rechter Arm	1256	–
	pKOSG <i>rrpB</i> KO Del	–	#1049 / #1046	Wildtyp	1893	1272, 621
		–	#0030 / #0222	linker Arm	1873	–
		–	#0221 / #0031	rechter Arm	1260	–
<i>rrpC</i>	pLPBLP <i>rrpC</i> KO Del	–	#1064 / #1065	Wildtyp	415	–
		–	#1064 / #1065	Wildtyp	415	–
		–	#0326 / #0325	linker Arm	783	–
	pKOSG <i>rrpC</i> KO Del	–	#0221 / #0327	rechter Arm	1271	–
		+	#0030 / #0031	entfernte BS ^(r)	1730	–
		+	#0030 / #0031	entfernte BS ^(r)	1711	–
<i>rrpA</i>	pLPBLP <i>rrpA</i> KO Del	+	#0030 / #0031	entfernte BS ^(r)	1730	–
	pKOSG <i>rrpA</i> KO Del	+	#0030 / #0031	entfernte BS ^(r)	1711	–
<i>rrpB</i>	pLPBLP <i>rrpB</i> KO Del	+	#0030 / #0031	entfernte BS ^(r)	1730	–
	pKOSG <i>rrpB</i> KO Del	+	#0030 / #0031	entfernte BS ^(r)	1711	–
<i>rrpC</i>	pKOSG <i>rrpC</i> KO Del	+	#0032 / #0033	entfernte BS ^(r)	1601	–

^a Details zur Analyse der potentiellen RdRP Deletionsstämme siehe Abschnitt 9.4.

13.3. Zusätzliche Abbildungen

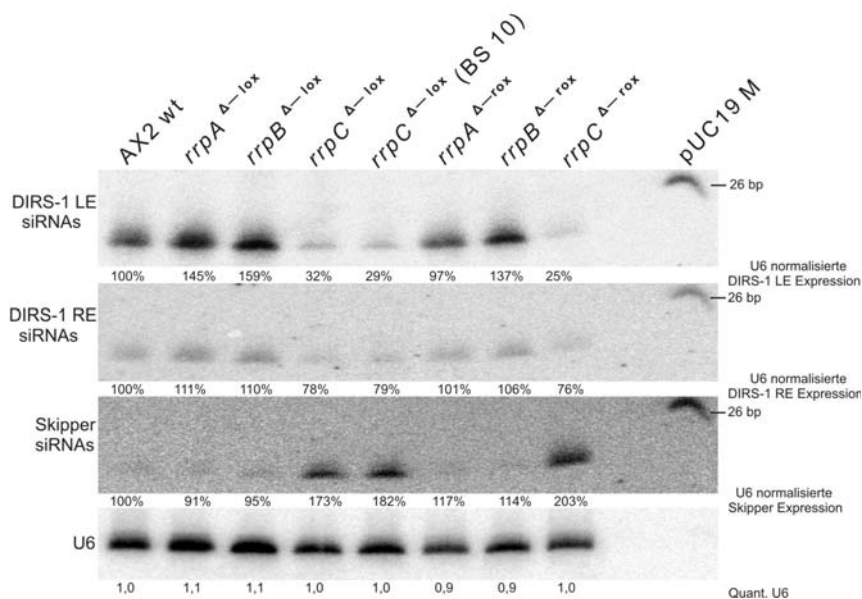


Abb. 13.1.: Biologisches Replikat eines Northern Blots zum Nachweis von DIRS-1 und Skipper siRNAs in RdRP *single* Deletionsstämmen.

Nachweis von DIRS-1 und Skipper siRNAs in den angegebenen Stämmen mit den Sonden DIRS-1 LE siRNAs, DIRS-1 RE siRNAs und SW99 nach UV-Crosslinking. Lademengen und Transfer-effizienzen wurde über U6 RNA überprüft. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas).

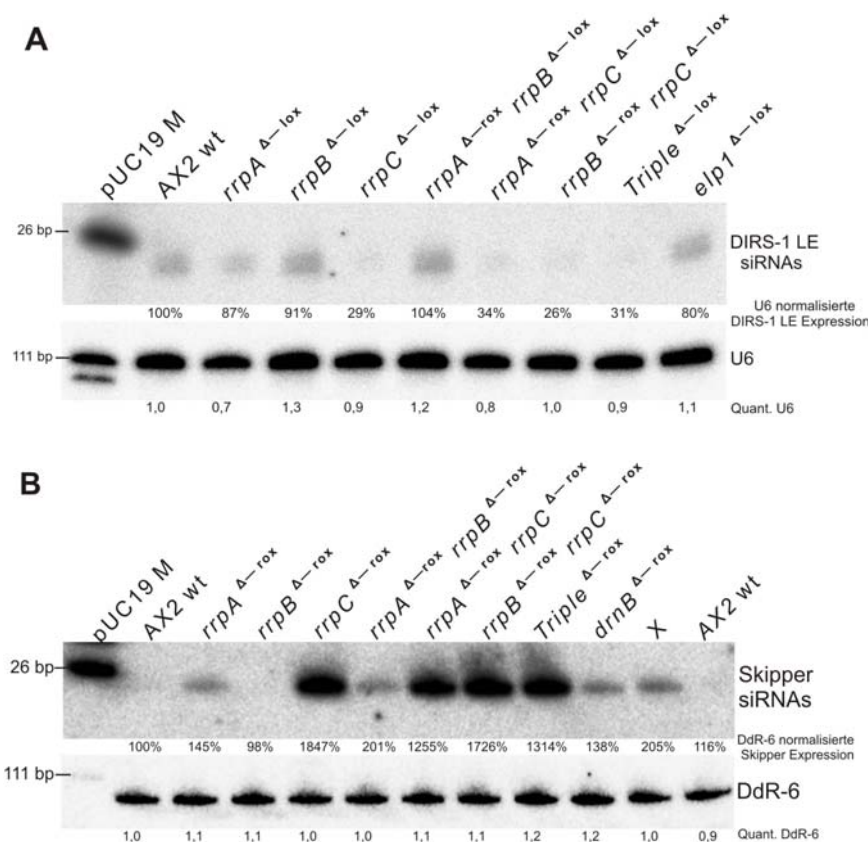


Abb. 13.2.: Biologische Replikate der Northern Blots zum Nachweis von DIRS-1 und Skipper siRNAs in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen.

A: Nachweis von DIRS-1 siRNAs in den angegebenen Stämmen mit der Sonde DIRS-1 LE siRNAs nach UV-Crosslinking. Lademengen und Transfer-effizienzen wurden über U6 RNA überprüft.

B: Nachweis von Skipper siRNAs mit der Sonde SW99 nach chemischen Crosslinking. Lademengen und Transfereffizienzen wurden über DdR-6 RNA überprüft. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas). X markiert Probe ohne Relevanz (*drnB* Über-expressionsstamm von J. Kruse, AG Ribogenetics, TU Darmstadt; unveröffentlicht).

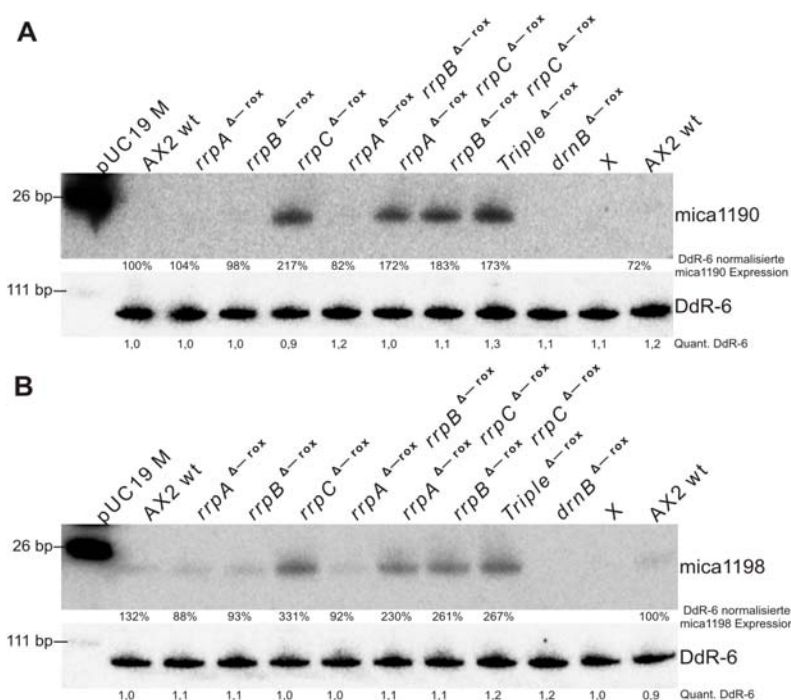


Abb. 13.3.: Biologische Replikate der Northern Blots zum Nachweis von microRNAs in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen.

Nachweis von mica1190 (A) mit der Sonde mica1190 und mica1198 (B) mit der Sonde mica1198 nach chemischen *Crosslinking*. Lademengen und Transfereffizienzen wurden über DdR-6 RNA überprüft. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas). X markiert Probe ohne Relevanz (*drnB* Überexpressionsstamm von J. Kruse, AG Ribogenetics, TU Darmstadt; unveröffentlicht).

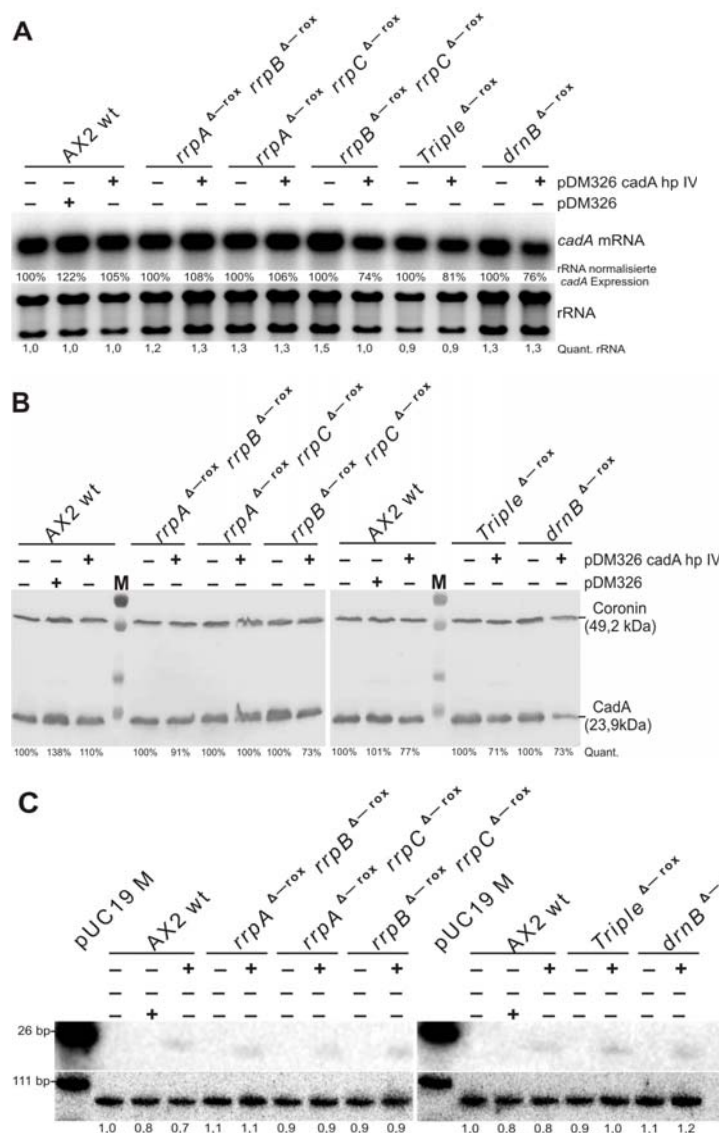
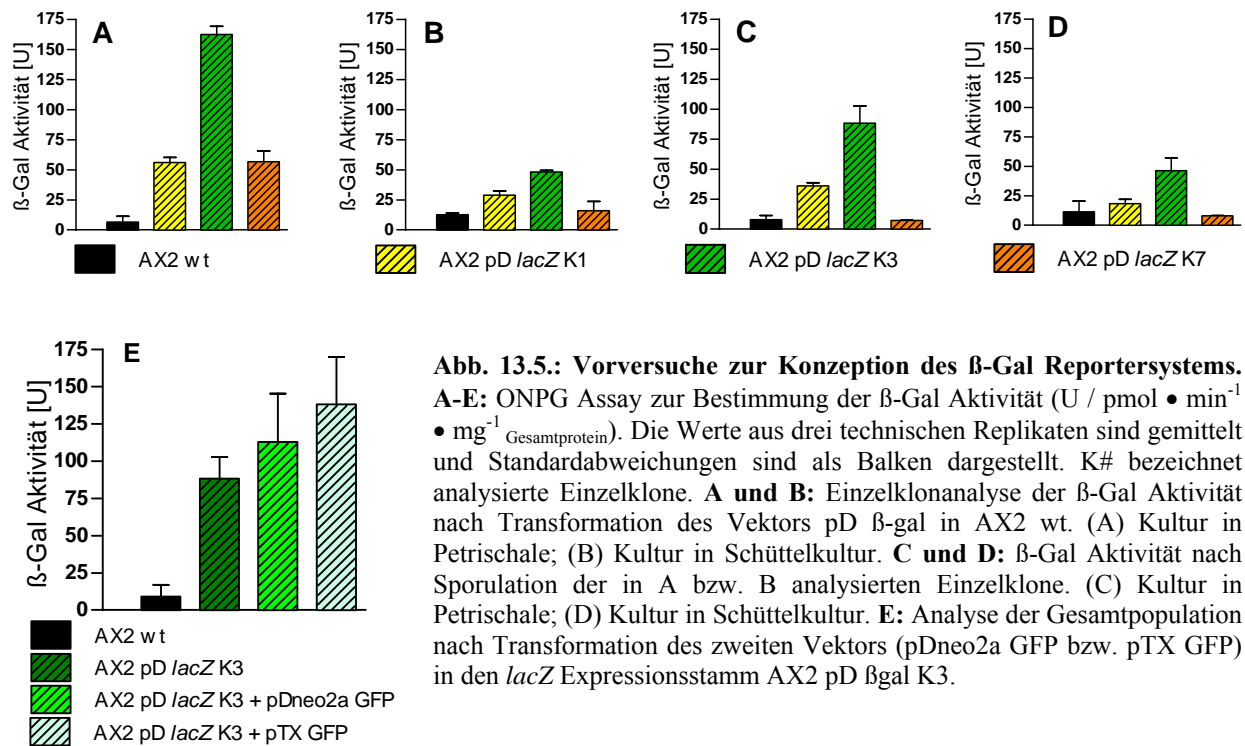


Abb. 13.4.: Analyse von *cadA* nach Transformation von pDM326 *cadA* hairpin IV in RdRP und *drnB* Deletionsstämmen.

A: Northern Blot zum Nachweis von *cadA* mRNA in den angegebenen Stämmen mit Hilfe der OLB Sonde *cadA* mRNA. Die Normalisierung der *cadA* mRNA erfolgte relativ zur rRNA Menge des jeweiligen Stamms. **B:** Western Blot zum semiquantitativen Nachweis von CadA und Coronin als Transferkontrolle. Die Quantifizierung der CadA Proteinmenge erfolgte jeweils relativ zum untransformierten RdRP Deletionsstamm. M bezeichnet den verwendeten Größenstandard (#SM1811 Fermentas). **C:** Northern Blot zum Nachweis von *cadA* siRNAs mit der OLB Sonde siRNAs II nach chemischen *Crosslinking*. Lademengen und Transfereffizienzen wurden über DdR-6 RNA überprüft. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas).



Tab. 13.6.: Einzelklonanalyse der β -Gal Aktivität nach Transformation von pDneo2a GFP bzw. pTX GFP in den *lacZ* Expressionsstamm.

AX2 pD <i>lacZ</i> K3	β -Gal Aktivität (# Einzelklone) ^a			Σ untersuchte Einzelklone
	< 75%	75% - 125%	> 125%	
+ pDneo2a GFP	6	4	4	14
+ pTX GFP	5	5	4	14

^a Änderung der β -Gal Aktivität relativ zur Expressionsstärke des β -Gal Expressionsstamms AX2 pD *lacZ* K3 vor Transformation des zweiten Vektors (pDneo2a GFP bzw. pTX GFP).

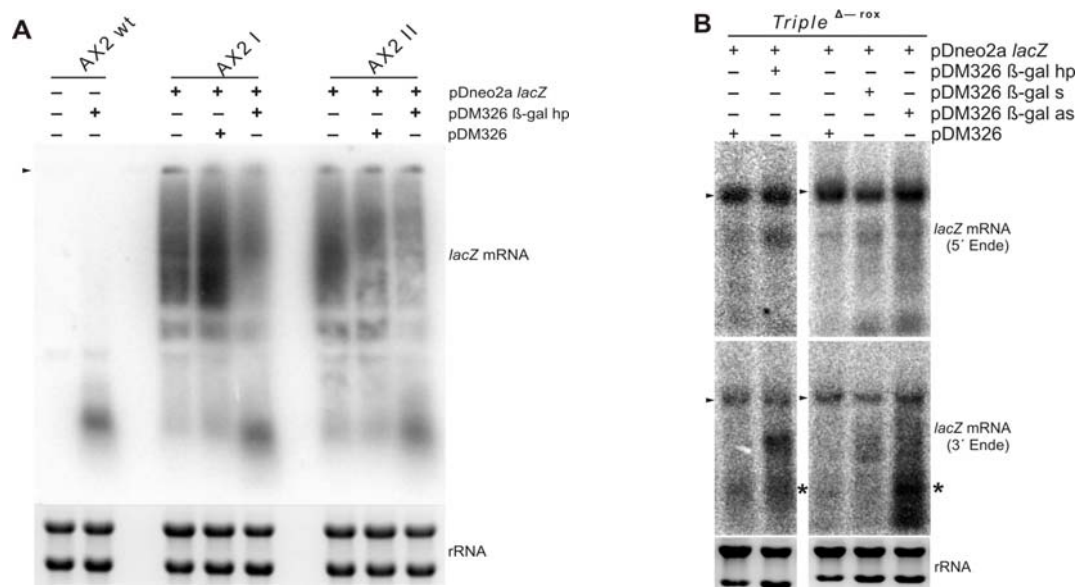


Abb. 13.6.: Northern Blots zum Nachweis der *lacZ* mRNA im β -Gal Reportersystem. **A:** Nachweis von *lacZ* mRNA und β -gal hairpin RNA mit der OLB Sonde β -gal siRNAs. AX2 I und II bezeichnet zwei unabhängige β -Gal Expressionsstämme. **B:** Exemplarische Darstellung der für das β -Gal Reportersystem durchgeführten Northern Blot Analysen in Gesamtgröße. Nachweis der *lacZ* mRNA erfolgte am 5' Ende (Sonde SW130) bzw. 3' Ende (Sonde SW148) der kodierenden Sequenz. \blacktriangleright markiert Volllängesignal der *lacZ* mRNA (3082 nt). * markiert unterschiedliche Degradationsprodukte verschiedener Länge der mRNA am 3' Ende der kodierenden Sequenz nach Transformation von pDM326 β -gal hairpin bzw. pDM326 β -gal antisense.

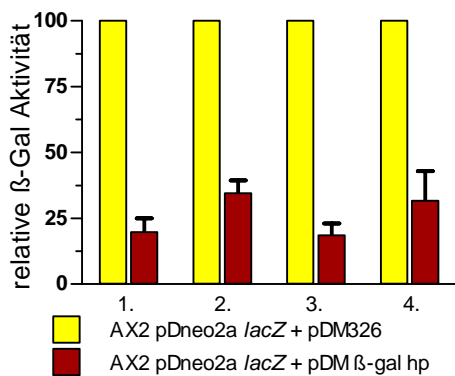


Abb. 13.7.: ONPG Assay zur Bestimmung der β-Gal Aktivität nach Transformation von pDM326 β-gal hairpin. Normierung der ermittelten β-Gal Aktivitäten erfolgte relativ zur Messung der β-Gal Aktivität nach Transformation des leeren Vektors pDM326 in β-Gal exprimierenden AX2 wt Stämme. Die graphische Darstellung beinhaltet Ergebnisse von vier biologischen Replikaten mit jeweils drei technischen Replikaten. Die entsprechenden Standardabweichungen sind als Balken dargestellt.

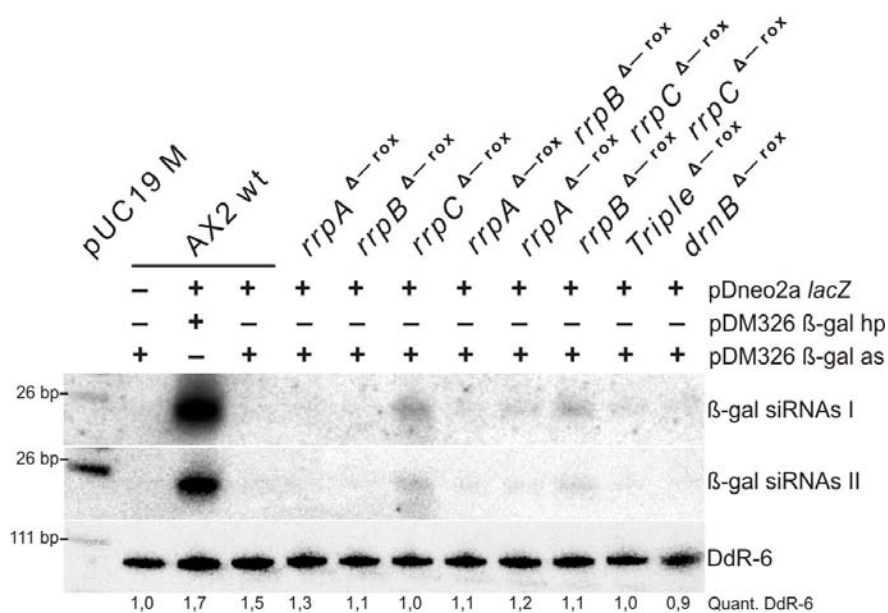


Abb. 13.8.: Northern Blot zum Nachweis von β-gal siRNAs nach Transformation von pDM326 β-gal antisense in β-Gal exprimierende Deletionsstämme.

Northern Blot nach chemischen *Crosslinking* zum Nachweis von β-gal siRNAs mit der OLB Sonde β-gal siRNAs (I) und OLB Sonde siRNAs 5' *upstream* (II). Nachweis von DdR-6 RNA diente als Lade- und Transferkontrolle. pUC19 M bezeichnet pUC 19 DNA/*Msp* I Marker (#SM0221 Fermentas).

13.4. Oligonukleotide

Tab. 13.7.: Oligonukleotide

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Klonierung der genomischen Sequenz der RdRPs		
#1113	rrpA_for PstI	CTGCAGAAATGGAGGTCGATTCCAAATCAAAAG
#1114	rrpA_rev BamHI	GGATCCTTTTATTTTATTTTATTTTAGCAAAATCACCCAATG
#1115	rrpB_for PstI	CTGCAGAAATGGAGGCCGATTCCAAATC
#1116	rrpB_rev BamHI	GGATCCTTTTATTTTATTTTATTTTAGCAAAATCACCCAATGTAAAATTC
#1117	rrpC_for SalI	GTCGACAATGTCAAATTATAATAATAACAATAATAATATACC
#1118	rrpC_rev XhoI	CTCGAGTTATTTGAGAAACTCTCTAATTTTATCAC
qRT-PCR		
#0122	TRX-1for	GAACGAGCTCCATGGCCAATAGAGTAATTC
#0123	TRX-1rev	CGCGGATCCTTATTTGTTTGCTTCTAGAGTA
#1123	rrpA_f_q58	CTGCTTTATTATTTTATCAAGAATCATTAGACATGCAT
#1124	rrpA_r_q58	GAACATTTTAACTATTTCTTCATTTACACTTCTCTC
#1125	rrpB_f_q58	GCTTTATTATTTTATCAAGAATCATTAGACATGCTC
#1126	rrpB_r_q58	GAACATTTTAACTATTTCTTCATTTACACTTCTCTG
#1127	rrpC_f_q58	GAAATCTTTTGGAAAATCAAGCATTGGTGTC
#1128	rrpC_r_q58	GGATCTCTTTGATATGATTAAACAACATATCCAAG
#1129	cinD_f_q58	TCAAAGAGCCAGAAATGCTTTGAAAATGAC
#1130	cinD_r_q58	ATTTGAGTGGTTTGCCAATTTCTTTTCCTC
#1257	oligo_dT_26	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Herstellung und Kontrolle von RdRP KO Stämmen		
#0021	BSr G1 5'	CGCTACTTCTACTAATTCTAGA
#0022	BSr G1 3'	TCTAGAATTAGTAGAAGTAGCG
#1044	RdRP-KO 5'2	AAAAGATCTTTGTACTCATCCTGGTGATG
#1046	RdRP3'K	GAAATCACCAATATAAACCAACTGATC
#1047	RdRP-KO 6'5	GAAGACGAGGAAGCAGAGTTCATTATAAC
#1048	RdRP-KO 3'3	TCCGAAGACTCTGGTTGAATTCTCTCTTTGC
#1049	RdRP5'K	GAAATCAATAATCTATTGGCATTGG
#1050	rrpC Pst 5'KO	CTGCAGGTGTTTGTCAAGTATTGGT
#1051	rrpC Hind 5'KO	AAGCTTAACTAGATATCTCTCAAAGAA
#1052	rrpC Hind 3'KO	AAGCTTCTACCATTATGACCATAG
#1053	rrpC BamHI 3'KO	GGATCCGAATGATTTCATATTCTC
#1069	rrpC 3'	GCTTCATCACGATCACTATTATTATC
#1070	rrpC 5'	CATCATCATCAATCACCTAATTTTG
#1142	rrpA Southern rev	CATCTGAAAACTTTCTAACATTATCAAC
Herstellung und Kontrolle von RdRP KO Deletionsstämmen		
#0022	AB_KO LA_for/NotI	GCGGCCGCGATTTAACTATAGACCAAGAATCTTG
#0023	AB_KO LA_rev/PstI	CTGCAGCTCTTGGTGTGTAAATACTCTTG
#0024	AB_KO RA_for/HindIII	AAGCTTCCAAAAGAAGTAAACATTTCGGTTAC
#0025	AB_KO RA_rev/SalI	GTCGACCAATAACATTGTAGCGGTTGAAC
#0026	C_KO LA_for/NotI	GCGGCCGCGAGCAACCAATGAAATTAAGTTG
#0027	C_KO LA_rev/PstI	CTGCAGCAGTATCTCTGGTTTCAACAAATAC
#0028	C_KO RA_for/HindIII	AAGCTTGAGTATCTAAACCATGAAAACCTTTAC
#0029	C_KO RA_rev/SalI	GTCGACCTCTAAAGGTTGTAGATATAAATAAAAC
#0030	AB_KO Del out LA	GGTGAACATGATTCAATAAGGTG
#0031	AB_KO Del out RA	GCTAAATTCATATGATCATTTTGATTCTC
#0032	C_KO Del out LA	CTGCATCGGTTTTAAAGAACGC
#0033	C_KO Del out RA	GATGATTCCAACCTTTCTTTTAATACC
#0034	A/B KO Del OLB LA	CTCTATATAGATTGATTCTAATTGTTTG
#0035	A/B KO Del OLB RA	GGTGAACAACACAAAGAGAATTG
#0047	AB_KO LA_for/IBA	AGCGCGTCTCCAATGCTGCAGGATTTAACTATAGACCAAGAATCTTG
#0048	AB_KO LA_rev/IBA	AGCGCGTCTCCGTTGCTCTTGGTGTGTAAATACTCTTG
#0049	AB_KO RA_for/IBA	AGCGCGTCTCCCTTCCCAAAAGAAGTAAACATTTCGGTTA
#0050	AB_KO RA_rev/IBA	AGCGCGTCTCCTCCCTGTCAGCAATAACATTGTAGCGGTTGAAC
#0051	C_KO LA_for/IBA	AGCGCGTCTCCAATGGAATTCGACCAACCAATGAAATTAAGTTG
#0052	C_KO LA_rev/IBA	AGCGCGTCTCCGTTGCAGTATCTCTGGTTTCAACAAATAC
#0053	C_KO RA_for/IBA	AGCGCGTCTCCCTTCGAGTATCTAAACCATGAAAACCTTTAC

#0054	C_KO RA_rev/IBA	AGCGCGTCTCCTCCCGAATTCCTCTAAAGGTTGTAGATATAAATAAAAAAC
#0324	loxP_for	GTTATCCATGGTTAATTAATTAACCC
#0325	loxP_rev	CTCGGATCTGATATCATAACTTC
#0326	C_KO Del out LA II	CCATTTAGACCAAGAATCCTTGG
#0327	C_KO Del out RA II	CAAAGAGATTATTTGAGAATGATGATTC
#0527	B_KO RA_for/HindIII	AAGCTTCCAAAAGAAGCAAATGTTTGG
#0528	B_KO RA_for/IBA	AGCGCGTCTCCCTTCCCAAAAGAAGCAAATGTTTGG
#0529	C_KO LA_forII	GCGGCCGCCGATTTTAGTTTTACCAACTGGTATG
#0530	C_KO LA_revII	CTGCAGCAAACCAGTAGCATTATGAACTTC
#0531	C_KO RA_forII	AAGCTTCTAAACATCCATCTTTAGTACCAAC
#0532	C_KO RA_revII	GTCGACGCTTAATAATGAAAGTTGCTGAGG
#0533	C_KO LA_fII_IBA	AGCGCGTCTCCAATGGAATTCGATTTTAGTTTTACCAACTGGTATG
#0534	C_KO LA_rII_IBA	AGCGCGTCTCCGTTGCCAAACCAGTAGCATTATGAACTTC
#0535	C_KO RA_fII_IBA	AGCGCGTCTCCCTTCCCTAAACATCCATCTTTAGTACCAAC
#0536	C_KO RA_rII_IBA	AGCGCGTCTCCTCCCGAATTCGCTTAATAATGAAAGTTGCTGAGG
#0537	C_KODO LA_for	GCGGCCGCGGTGTTGCATCAACAAAGAAAAAC
#0538	C_KODO LA_rev	CTGCAGCATTGGTAACTTTATCTTCCAATAC
#0539	C_KODO LA_for/IBA	AGCGCGTCTCCAATGGAATTCGGTGTTCATCAACAAAGAAAAAC
#0540	C_KODO LA_rev/IBA	AGCGCGTCTCCGTTGCATTGGTAACTTTATCTTCCAATAC
#1064	rrpc2	GACTTTATTGAATTGTAATGGTGG
#1065	rrpc3	CAGTGATAGTGATAGTGACGG
#1502	OLB-SB_BSR-for	CGGGTATATTTGAGTGGAATGAG
#1503	OLB-SB_BSR-rev	GGATCAATTTAACATTTCTCAACAAG
#1582	drnB KO LA out	GATTGATTTAAAAAAGAGAATATTGATAGTG
#1583	drnB KO RA out	GAATTTTAAATCATCTTCACTATCTGATC
#1584	G418_for	GGCTCGCGATAATGTCCGGC
#1585	G418_rev	CCATGAGTGACGACTGAATCCGG

Veränderungen endogene RNAs in RdRP Deletionsstämmen

#1198	Actin for	TTAGCCTACGTCGCTCTCG
#1199	Actin rev	GGGAACATAGTTGTACCACCT
#1200	SW096 U6_Northern	GGATGCCTGCCGGTTGCCCGGAGG
#1201	SW097 Dirs_siRNA-LE	GGCCATTACTCCCACTACTGG
#1202	SW098 Dirs_siRNA-RE	ACCTCGATTGGAGTCAATGGA
#1203	SW099 Skipper_siRNA	AGCTAAAACCATTGATGCTTT
#1514	SW149 mical190	GCTTTCCTTGATAAAAAATTGG
#1515	SW150 mical198	GAACCATTAAACCCTAATCG
#1522	DIRS REs for	CTATTCTGAACAACCTTTGGAA
#1523	DIRS REs revT7	GTTAATACGACTCACTATAGGGTCCATTGACTCCAATCGAGGT
#1524	DIRS REas forT7	GTTAATACGACTCACTATAGGGCTATTCTGAACAACCTTTGGAA
#1525	DIRS REas rev	TCCATTGACTCCAATCGAGGT
#1526	DIRS LEs for	AGTAAATCCAGTAGTGGGAGT
#1527	DIRS LEs revT7	GTTAATACGACTCACTATAGGGTGATGCAATCTGATTTTCGGA
#1528	DIRS LEas forT7	GTTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAATCCAGTAGTGGGAGT
#1529	DIRS LEas rev	GTGATGCAATCTGATTTTCGGA
#1647	SW169 DDsno5	GGCCAACAATTTTCTCAGCAAGAC

cadA Reportersystem

#0328	cadA_OLB_for	CTCCAACCTCCAGGAAAATTCC
#0329	cadA_OLB_rev	GTCATATGGTGTATGTGTTTGAC
#1015	cadH_rev_SpeI	ACTAGTAAATCTAGAATGTCTGTTGATGCAAATAAAGTAAAATTC
#1016	cadH_rev_BglII	AGATCTCAGAGTTTAAAGTTAAAGATGAAAGATG
#1194	cad_s_BglII	AGATCTTCTGTTGATGCAAATAAAGTAAAATTCTTC
#1195	cad_s_SpeI	ACTAGTCAGAGTTTAAAGTTAAAGATGAAAGATG
#1205	SW101 cadA_siRNA-1	TATCACCATTGTTGAATCTTACAGTTTCAC
#1206	SW102 cadA_siRNA-2	GATGTAACATTTGGGAGCATAATGAAATTGATACTCCAAC
#1207	SW103 cadA_siRNA-3	CAAAGTTAATTCAACTGCTGGTTCATATGA
#1387	cadH_for_XbaI_volII	TCTAGAGGTGATAAATGGAATGATAAATTCATG
#1388	cadH_for_SpeI_volII	ACTAGTCAGAGTTTAAAGTTAAAGATGAAAGATG
#1489	cad_HS_BglII	AGATCTATGTCTGTTGATGCAAATAAAGTAAAATTC
#1490	cad_HS_SpeI	ACTAGTTTGTATATCGAGGTTAAATCATTGTTGTACTGC
#1491	cad_HAS_SpeI	ACTAGTATGTCTGTTGATGCAAATAAAGTAAAATTC
#1492	cad_HAS_EcoRV	GATATCGGAATTTTCTGGAGTTGGAG
#1612	cad_HS-ATG_BglII	AGATCTCTGTTGATGCAAATAAAGTAAAATTCTTC

β-gal Reportersystem

#0182	β-Gal 5'	CTGCAGAAAAAATGACCATGATTACGGATTCACTG
#0183	β-Gal 3'	CTCGAGTTATTTTTGACACCAGACCAACTGG
#0184	GalH_fw_DraIII	CACGCTGTGTGTGATCATCTGGTCGCTGG
#0185	GalH_fw_SpeI	ACTAGTCCGTCAGCGCTGGATGC
#0186	GalH_rev_SpeI	ACTAGTAAACACGCTGTGCGACCGC
#0187	GalH_rev_BglII	AGATCTCCGTCAGCGCTGGATGC
#0188	GFP_L_AvaI	AACTCGGGCATTCTTGGACACAAATTGGAATAC
#0189	GFP_L_SpeI	TTACTAGTTTCACAGCGTGGCTTCCATCTTCAATGTTGTGTC
#0190	Gal_rev_SpeI	ACTAGTGCAGAACAACTTTAACGCCGTG
#0191	Gal_rev_BglII	AGATCTCCATGCGGTCGCGTTTCG
#1196	Gal_s_BglII	AGATCTGCAGAACAACTTTAACGCCGTG
#1197	Gal_s_SpeI	ACTAGTCCATGCGGTCGCGTTTCG
#1390	SW120_Gal_siRNAsI	CGATCCTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAAGG
#1392	SW122_Gal_siRNAs-5'UP	CCGGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCG
#1393	SW123_Gal_siRNAs-3'DW	GCAGCAGTTTTTCCAGTTCGTTTATCCGG
#1425	SW130_OligoI_mRNA_Gal	GTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATCCGTAATCATGG
#1494	Gal_5'OLB-for	GCCGATCGCGTCACACTACGTC
#1495	Gal_5'OLB-rev	CGCGTTACGCGTTCGCTCATCG
#1513	SW148_OligoIII_mRNA_Gal	GACACCAGACCAACTGGTAATGGTAGCGACCGGCGCTC

Primer für Sequenzierungen

#0037	pDneo2 term	CAATTGATGGACGACCCGAG
#0038	pDneo2 Act15	GGACGGAGAAGATGTTCAAG
#0039	#479/544 loop for	CTCGTATTGGTGTTCACCAAG
#0040	#479/544 loop rev	GAATAGACTTTGTTAGCATTCCAAG
#0163	FUSION-Primer for	GGGAATAAGGGCGACACGG
#0164	FUSION-Primer rev	GAGCGTCGATTTTTGTGATGC
#0219	Gal_seq_for	CGCTTTAATGATGATTTTCAGCCG
#0220	Gal_seq_rev	CAATGTCGTTATCCAGCGGTG
#0223	SP6 Promotor seq	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC
#0224	T7 Promotor seq	TAATACGACTCACTATAGGG
#1054	rrpA1	ATGGAGGTGATTCCAAATCAAAAG
#1055	rrpA2	CCATTGGCTATCAATGGTTTAATCAC
#1056	rrpA3	GGTATTGGTCAATTGGATGATTCATTG
#1057	rrpA4	GATGTTAATTCTTTGACAATCAATAAACGAC
#1058	rrpA5	CATTGTTAAGACATTATTCAGCAGAATC
#1061	rrpB4	AATGTTAATTCTTTGACAATCATTAAACGAC
#1062	rrpB5	CATTGTTAAGACATTATTCAGCGGAG
#1066	rrpC4	CTATCTTCTTCACCAATGAGTG
#1067	rrpC5	CCAAATTTCAAACAATGTTTCAGG
#1088	rrpC III/1_for/seq	CTATAATTCAATTCAAAACCTTTTCTATC
#1089	rrpC III/1_rev/seq	CGATATCACTTTCTTCAAATTCC
#1090	rrpCI/1_for/seq	CACTGAAAGAGCAACCAATG
#1091	rrpC II/9_for/seq	CTCCACCTCTAACATTTGAAG
#1092	rrpCII/9_rev/seq	GAGAACCTTTACAGATGAAATAG
#1094	rrpCI/1_rev/seq	CTATCTCTACCACGACGTTG
#1096	rrpAII_seq_for	CACTTCATGAGAATAGAATTAAACC
#1097	rrpAII_seq_rev	GCATTTGTAGAGTACATTGAGG
#1098	rrpB II_seq_for	CATTGGAACCACTTCAAGGTG
#1099	rrpB II_seq_rev	CCAAGTTCTTGACGTTCAAC
#1100	rrpB III_seq_for	CATTGGTACAACAACAATACATTAC
#1137	rrpB I_seq_for	CTGGTATGGGTAAGACATTGG
#1138	rrpB I_seq_rev	GCTCTCTAAAAGTTTCAATATCAATTTG
#1139	rrpB II/m_seq_for	GATGTTTTTATAACACCAAGTAGAAC
#1143	rrpAI_seq_for	CCAAGAATGGAAACAAAAGATGTTG
#1144	rrpAI_seq_rev	GATCTAGCTCTACCTCTACG
#1145	rrpAIII_seq_m	CATTGTTTGTGATAGTGAAACTGG
#1258	pJET1 for seq	GCCTGAACACCATATCCATCC
#1259	pJET1 rev seq	GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC
#1508	pJET1.2 for seq	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
#1509	pJET1.2 rev seq	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

14. Danksagung

Als erstes gilt mein Dank vor allem Dr. Christian Hammann, der mir ermöglicht hat, dieses interessante und vielschichtige Thema zu bearbeiten. Seine kontinuierliche Unterstützung und seine konstruktiven Hinweise und Anregungen halfen mir stets bei meiner Forschungsarbeit. Prof. Dr. Göringer danke ich für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen.

Weiterhin danke ich:

- Dr. Fredrik Söderbom für meinen Forschungsaufhalt in seinem Labor in Uppsala, welcher durch konstruktive Kooperation und informativen Austausch mit ihm und seinem Laborteam, geprägt war.
- Lotta Avesson für die Einweisung in die Methotik zum Nachweis kleiner RNAs.
- Benjamin Boesler für kritische Anmerkungen und Hinweise am Manuskript dieser Arbeit und für konstruktive Diskussionen über Probleme mit Dicty...
- Thomas Winckler, Lotta Avesson (AG F. Söderbom), Anika Schmidt (AG T. Winkler) und Carsten Seehafer (AG C. Hammann) für die Erlaubnis unveröffentlichte Ergebnisse aus Gemeinschaftsprojekten in dieser Arbeit aufführen zu dürfen.
- der AG Göringer für die Möglichkeit Geräte der Abteilung nutzen zu dürfen.
- allen Mitarbeitern der Abteilung Genetik an der Universität Kassel und der AG Ribogenetics an der TU Darmstadt für eine angenehme Arbeitsatmosphäre.
- S. Kasten, S. Fuhrmann und S. Eilhardt für die Herstellung allgemeiner Puffer und Lösungen sowie Organisation des Laboralltags.
- für finanzielle Unterstützung dem Otto Braun Fond und der Lieberum Stiftung.

Auch möchte ich bei dieser Danksagung nicht meine Familie und Freunde vergessen, die mich während der gesamten Zeit in jeder Hinsicht unterstützten.

15. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Stephan Wiegand
Geburtsdatum	28. Januar 1982
Geburtsort	Kassel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Kontakt	wiegand.stephan@gmx.net

Schulbildung

07.06.2001	Gymnasiale Oberstufe „Herderschule“ Kassel Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
------------	--

Studium

2002 – 2007	Universität Kassel/ Studiengang: Diplombiologie Diplomarbeit in der Abt. Genetik, Univ. Kassel; AG Dr. C. Hammann Thema: Klonierung und Charakterisierung von RNA abhängigen RNA-Polymerasen aus <i>Dictyostelium discoideum</i>
26.11.2007	Abschluss: Diplombiologe

Promotion

02/2008 – 04/2010	Beginn der Promotion in der Abt. Genetik, Univ. Kassel, AG Dr. C. Hammann Thema: Funktionelle Charakterisierung von RNA abhängigen RNA Polymerasen aus <i>Dictyostelium discoideum</i>
10/2008 – 09/2010	Finanzierung durch ein Promotionsstipendium des Otto-Braun-Fonds an der Univ. Kassel
05/2010 – 05/2012	Fortsetzung der Promotion an der TU Darmstadt, AG Ribogenetics, AG Dr. C. Hammann